



WO 9606941A1

(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> : <b>C12N 15/85, A61K 48/00</b>		<b>A1</b>	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 96/06941</b>
			(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 7. März 1996 (07.03.96)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP95/03371 (22) Internationales Anmeldedatum: 25. August 1995 (25.08.95) (30) Prioritätsdaten: 9417366.3 26. August 1994 (26.08.94) GB 9506466.3 29. März 1995 (29.03.95) GB 195 24 720.5 12. Juli 1995 (12.07.95) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BEHRINGWERKE AG [DE/DE]; Emil-von-Behring-Strasse 76, D-35041 Marburg (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SEDLACEK, Hans-Harald [DE/DE]; Sonnenhang 3, D-35041 Marburg (DE). MÜLLER, Rolf [DE/DE]; Poitierstrasse 8, D-35037 Marburg (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: AM, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CZ, EE, FI, GE, HU, JP, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LT, LV, MD, MG, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SI, SK, TJ, TT, UA, US, UZ, VN, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO Patent (KE, MW, SD, SZ, UG). Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.	
(54) Title: GENETIC THERAPY OF DISEASES CAUSED BY THE IMMUNE SYSTEM, SAID THERAPY USING A CELL-SPECIFIC ACTIVE SUBSTANCE REGULATED BY THE CELL CYCLE (54) Bezeichnung: GENTHERAPIE VON ERKRANKUNGEN, DIE DURCH DAS IMMUNSYSTEM BEDINGT SIND, MIT HILFE EINES ZELLSPEZIFISCHEN ZELLZYKLUSREGULIERTEN WIRKSTOFFES (57) Abstract <p>The invention concerns a DNA sequence for the genetic therapy of diseases caused by the immune system. The essential components of the DNA sequence consist of an activator sequence, a promoter module and a gene for the active substance. The activator sequence is activated cell or virus-specifically and the promoter module regulates this activation specifically according to the cell cycle. The choice of activator sequence and active substance depends on the indications. The DNA sequence is introduced into a viral or non-viral vector, supplemented by a ligand having affinity for the target cell. Depending on the choice of activator sequence and active substance, the following conditions can be treated by administration of the DNA sequence: the defective formation of blood cells; autoimmune diseases and allergies as well as rejection reactions against transplanted organs; chronic arthritis; viral and parasitic infections as well as the prevention of viral, bacterial and parasitic infections; leukaemias.</p> (57) Zusammenfassung <p>Es wird eine DNA-Sequenz für die Gentherapie von Erkrankungen bedingt durch das Immunsystem beschrieben. Die DNA-Sequenz besteht in ihren wesentlichen Elementen aus einer Aktivatorsequenz, einem Promotormodul und einem Gen für die Wirksubstanz. Die Aktivatorsequenz wird zell- oder virusspezifisch aktiviert und diese Aktivierung zellzyklusspezifisch reguliert durch das Promotormodul. Die Wahl von Aktivatorsequenz und Wirksubstanz richtet sich nach dem Indikationsgebiet. Die DNA-Sequenz wird eingefügt in einen viralen oder nicht-viralen Vektor, ergänzt um einen Liganden mit Affinität zur Zielzelle. Je nach Wahl der Aktivatorsequenz und Wirksubstanz können durch Verabreichung der DNA-Sequenz behandelt werden: mangelhafte Bildung von Blutzellen, Autoimmunerkrankungen und Allergien, des weiteren Abstossungsreaktionen gegen transplantierte Organe, chronische Gelenkentzündungen, virale und parasitäre Infektionen, des weiteren Prophylaxe von viralen, bakteriellen und parasitären Infektionen, Leukämien.</p>			

# **LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	GA	Gabon	MR	Mauretanien
AU	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	IE	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	ML	Mali	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Mongolei	VN	Vietnam

**Gentherapie von Erkrankungen, die durch das Immunsystem bedingt sind, mit Hilfe eines zellspezifischen zellzyklusregulierten Wirkstoffes.**

---

### Technisches Gebiet

Es wird eine DNA-Sequenz für die Gentherapie von Erkrankungen bedingt durch das Immunsystem beschrieben.

Die DNA-Sequenz besteht in ihren wesentlichen Elementen aus einer Aktivatorsequenz, einem Promotormodul und einem Gen für die Wirksubstanz.

Die Aktivatorsequenz wird zell- oder virusspezifisch aktiviert und diese Aktivierung zellzyklusspezifisch reguliert durch das Promotormodul. Die Wahl von Aktivatorsequenz und Wirksubstanz richtet sich nach dem Indikationsgebiet. Die DNA-Sequenz wird eingefügt in einen viralen oder nicht-viralen Vektor, ergänzt um einen Liganden mit Affinität zur Zielzelle.

Je nach Wahl der Aktivatorsequenz und Wirksubstanz können durch Verabreichung der DNA-Sequenz behandelt werden:

- mangelhafte Bildung von Blutzellen
- Autoimmunerkrankungen und Allergien desweiteren Abstoßungsreaktionen gegen transplantierte Organe
- chronische Gelenkentzündungen
- virale und parasitäre Infektionen, desweiteren Prophylaxe von viralen, bakteriellen und parasitären Infektionen
- Leukämien.

Ein fehlerhaftes Immunsystem verursacht äußerst vielgestaltige Erkrankungen. Zu ihnen gehören beispielsweise

- die unzureichende Bildung von Zellen des Blutes durch mangelnde Cytokine
- Allergien, Autoimmunerkrankungen und chronischen Entzündungen, im besonderen chronische Gelenkentzündungen durch Fehlfunktionen des Immunsystems
- Abstoßung transplanterter Organe durch eine unzureichende Hemmbarkeit des Immunsystems
- mangelhafte Impferfolge und chronische Infektionen, z.B. durch Viren im Gefolge einer Immunschwäche
- Leukämien und Lymphome als tumoröse Entartung des Immunsystems.

Die derzeitigen therapeutischen Möglichkeiten für derartige Erkrankungen sind bekanntermaßen unzureichend. Dieses soll an einigen Beispielen dargestellt werden.

### 1) Therapie mit Cytokinen

Mittlerweile sind eine beträchtliche Anzahl von Cytokinen und Wachstumsfaktoren bekannt, welche in die Differenzierung, Vermehrung, Reifung und Funktion von Zellen eingreifen.

So wird beispielsweise das blutbildende System gesteuert von einer Hierarchie von verschiedenen Cytokinen, welche durch ihre unterschiedlichen Funktionen die Vermehrung der einzelnen Differenzierungsstufen und über die einzelnen Differenzierungsstufen hinweg die fortlaufende Bildung von ausgereiften Blutzellen wie Erythrozyten, Thrombozyten, Granulozyten, Makrophagen und Lymphozyten gewährleisten (Dexter et al., Haematopoietic Growth Factors, Gardiner Well Communication, Macclesfield (1993)).

Des weiteren ist bekannt, daß Cytokine und Wachstumsfaktoren eine bedeutende Rolle spielen bei der Kooperation von Zellen miteinander (Pusztal et al., J. Pathol. 169, 191 (1993), Cross et al., Cell 64, 271 (1991)).

So wird beispielsweise bei der Immunabwehr die Zusammenarbeit zwischen antigenpräsentierenden Zellen, T-Lymphozyten und B-Lymphozyten gesteuert von unterschiedlichen Cytokinen, wobei deren Reihenfolge und Konzentration entscheidend ist für Art und Stärke der Immunreaktion (Aulitzky et al., Drugs 48,

667 (1994), Sedlacek et al., Immune Reactions, Springer Verlag (1995)). Des weiteren wird die Abwehr von Infektionserregern, wie beispielsweise von Viren, beeinflußt wie auch gestützt von Cytokinen wie beispielsweise Interferonen (Edgington, Biotechnol. 11, 465 (1993)).

Die Kenntnis dieser Zusammenhänge hat bereits zur Entwicklung von Cytokinen für die Therapie von Erkrankungen des Menschen geführt, beispielsweise von

- Erythropoietin für die Behebung der Anämie
- G-CSF für die Behebung der Neutropenie
- GM-CSF für die Behebung der Leukopenie
- IL-2 für die Immunabwehr gegen ausgewählte Tumoren
- IFN $\alpha$  für die Therapie der chronischen Virushepatitis
- IFN $\beta$  für die Therapie der multiplen Sklerose

Weitere Cytokine befinden sich derzeit in Prüfung (Aulitzky et al., Drugs 48, 667 (1994)). So beispielsweise

- Thrombopoietin für die Behebung der Thrombozytopenie (Metcalf, Nature 369, 519 (1994))
- IL-3 für die Tumorthherapie (de Vries et al., Stem Cells 11, 72 (1993) und für die Unterstützung bei der Behebung von zytopenischen Zuständen des blutbildenden Systems (Freudl, Int. J. Immunopharm. 14, 421 (1992))
- IL-4 für die Tumorthherapie (Manate et al., Blood 83, 1731 (1994))
- IL-6 für die Behebung von zytopenischen Zuständen des blutbildenden Systems (Brack et al., Int. J. Clin. Lab. Res. 22, 143 (1992))
- IL-10 für die Immunsuppression (Benjamin et al., Leuk. Lymph. 12, 205 (1994))
- IL-11 für die Behebung der Thrombozytopenie (Kobayashi et al., Blood 4, 889 (1993))
- IL-12 für die Tumorthherapie (Tahara et al., Cancer Res. 54, 182 (1994))
- TNF $\alpha$  für die Tumorthherapie (Porter, Tibtech 9, 158 (1991)).

Der Therapie mit allen Cytokinen gemeinsam ist der Nachteil, daß sie meist über einen längeren Zeitraum täglich parenteral zu verabreichen sind und des weiteren, daß zu ihrer bestmöglichen Wirksamkeit mehrere Cytokine in der notwendigen

hierarchischen Reihenfolge nacheinander injiziert werden oder entsprechende Cytokine in ausreichender Konzentration im Körper vorhanden sein müssen.

Entscheidend für die Wirkung ist die Konzentration der jeweiligen Cytokine am Ort der zu stimulierenden Zelle. Der Einfachheit halber werden die Cytokine täglich subkutan oder i.m. injiziert. Diese Applikationsart gewährleistet eine angestrebte verzögerte systemische Verteilung, andererseits sind relativ hohe Mengen zu verabreichen, um eine ausreichende Konzentration lokal am Ort der gewünschten Wirkung zu gewährleisten. Die hierdurch bedingte erhöhte Dosis stellt aufgrund des hohen Herstellpreises der Cytokine einen beträchtlichen Kostenfaktor dar, der die Verwendung von Cytokinen erheblich einschränkt.

Darüber hinaus verursachen einige Cytokine im therapeutischen Dosisbereich beträchtliche Nebenwirkungen. So beispielsweise IL-1 (Smith et al., New Engl. J. Med. 328, 756 (1993)), IL-3 (Kurzrock et al., J. Clin. Oncol. 9, 1241 (1991)) und IL-2 (Siegel et al., J. Clin. Oncol. 9, 694 (1991)).

Es besteht somit ein erheblicher Bedarf nach neuen Verfahren, Cytokine, bzw. Kombinationen von Cytokinen über einen längeren Zeitraum in ausreichender Konzentration am Ort ihrer Wirkung zur Verfügung stellen zu können.

## 2) Die chronische Gelenkentzündung

Die chronische Gelenkentzündung ist trotz verbesserter antientzündlicher und immunsuppressiver Medikamente eine nur unzulänglich therapierbare Erkrankung, welche die Lebensqualität erheblich einschränkt und sogar die Lebenserwartung verkürzen kann (Pincus et al., Bull. Rheum. Dis. 41, 1 (1992)). Durch ihre Häufigkeit (ca. 10% der Bevölkerung in der westlichen Welt leidet an Arthritis) stellt die Arthritis einen erheblichen volkswirtschaftlichen Kostenfaktor dar.

In Anbetracht der unzulänglichen medikamentösen Therapie ist für viele Patienten die chirurgische Entfernung der Synovia der Gelenkkapsel (Synovektomie) oder der chirurgische Gelenkersatz die letztmögliche Therapieform.

In Anbetracht dieser medizinischen und volkswirtschaftlichen Probleme stellt die chronische Arthritis eine Herausforderung für die Arzneimittelforschung dar.

Es ist jedoch bereits heute abzusehen, daß Medikamente, gleich welcher Art, die oral oder parenteral verabreicht werden, Schwierigkeiten haben werden, in ausreichender Konzentration den Entzündungsbereich des Gelenkes zu erreichen, da sie durch die synovialen Kapillaren passiv durch das Synovium in den Gelenkraum und von dort in die das Gelenk auskleidende Zellen diffundieren müssen (Evans et al., Gene Therapeutics, J. Wolff, Editor, page 320, Birkhäuser, Boston 1994).

Diese Diffusion wird zusätzlich dadurch erschwert, daß die Vaskularisierung des Synoviums beispielsweise bei der rheumatoiden Arthritis deutlich vermindert ist (Stevens et al., Arthritis Rheum. 34, 1508 (1991)). Eine intraartikuläre Injektion von Medikamenten umgeht zwar das Problem der Diffusion, aufgrund der hohen Resorptionsrate ist die Verweildauer des Medikamentes im Gelenk jedoch so kurz, daß über einen längeren Zeitraum mehrfache intraartikuläre Injektionen notwendig sind. Diese sind wiederum mit dem erheblichen Risiko einer Gelenkinfektion behaftet. Zudem können sie durch die notwendige hohe lokale Konzentration des Medikaments in erheblichem Maße Nebenwirkungen verursachen.

Zur Behebung dieser Probleme wurde die systemische oder die lokale intraartikuläre Verabreichung von Vektoren oder von in vitro transduzierten Synovialzellen zur Therapie der chronischen Arthritis vorgeschlagen (Bandara et al., DNA Cell Biol. 11, 227 (1992), BBA 1134, 309 (1992) Evans et al., Transplant. Proc. 24, 2966 (1992)).

Das Prinzip dieser Gentherapie ist, durch in vivo im Gelenkraum transduzierte Zellen oder durch die Injektion von in vitro transduzierten Synovialzellen in den Gelenkraum hohe Konzentrationen von antiarthritischen Substanzen zu erreichen, wie beispielsweise (Evans et al., J. Rheumatol. 21, 779 (1994))

- antiinflammatorischen Cytokinen  
(z.B. IL-1-Rezeptor Antagonist, IL-4 oder IL-10)
- Cytokininhibitoren  
(z.B. lösliche Rezeptoren für IL-1,  $\text{TNF}\alpha$ , IL-8,  $\text{TGF}\beta$ , oder für andere, die Entzündung verstärkende Cytokine und Interleukine)

- Enzyminhibitoren  
(z.B. TIMP, LIMP, IMP, PAI-1, PAI-2, andere)
- Antiadhäsionsmolekülen  
(z.B. lösliches CD-18, ICAM-1, lösliches CD44)
- Antagonisten von Sauerstoffradikalen  
(z.B. Superoxiddismutase)
- oder von
- Wachstumsfaktoren für Knorpelzellen  
(z.B. TGF $\beta$  oder IGF-1)

Tierexperimentell konnten im Kaninchen Anhaltspunkte für eine Wirksamkeit von IL-1-RA exprimiert nach intraartikuläre Injektion des entsprechenden Gens nachgewiesen werden (Bandara et al., PNAS 90, 10764 (1993), Hung et al., Gene Therapy 1, 64 (1994)).

Grundsätzlich sind jedoch diese bislang vorgeschlagenen Methoden zur Gentherapie mit erheblichen Nachteilen behaftet:

- Bei der in vitro Transduktion von Synovialzellen sind diese aus dem Gelenkraum zu entnehmen. Dieses alleine belastet den Patienten und birgt in sich das Risiko einer Gelenkinfektion. Zum anderen sind Synovialzellen nur sehr schwierig und in geringer Zahl zu gewinnen. Somit müssen die Synovialzellen in vitro vermehrt werden, um sie in ausreichender Zahl transduzieren zu können. Es ist jedoch bekannt, daß nur die Fibroblasten-ähnlichen Synovialzellen (Typ B) sich unter Standard-Zellkulturbedingungen vermehren lassen, nicht jedoch der den Makrophagen ähnelnde Typ A (Evans et al., Gene Therapeutics, page 320, J.A. Wolff, Editor, Birkhäuser Boston (1994)). Die Injektion von in vitro transduzierten Synovialzellen ist somit mit erheblichen Problemen belastet und wird technisch meist nicht oder nur mit erheblichem Aufwand zu bewerkstelligen sein.
- Bei der zur Diskussion stehenden systemischen oder intraartikulären Injektion von Vektoren zur in vivo Transduktion von Zellen (Evans et al., Gene



Therapeutics, page 320, J.A. Wolff, Editor, Birkäuser Boston (1994)) fehlt ein Regelmechanismus, welcher nur in solchen Zellen, welche bei der chronischen Arthritis involviert und nur dann, wenn sie im Sinne einer Entzündung aktiviert sind, eine Expression der über den Vektor transferierten Gene erlaubt. Ohne einen derartigen Regelmechanismus werden nach systemischer Verabreichung des Vektors verteilt im gesamten Körper Zellen transduziert, die jeweilige antiarthritische Substanz zu produzieren, was entweder zu einer systemischen Beeinflussung der Immunreaktion führen würde, oder aber in bezug auf den arthritischen Entzündungsprozeß gleichbedeutend wäre mit der an sich bereits als unwirksam oder unzureichend wirksam angesehenen, wiederholten systemischen Gabe von antiarthritischen Wirkstoffen.

Nach lokaler Verabreichung würden je nach verwendetem Vektor entweder vorzugsweise proliferierende Zellen (bei Verwendung eines RTV-Vektors) oder aber zusätzlich auch ruhende Zellen (bei Verwendung anderer viraler oder nicht-viraler Vektoren) in vivo transduziert werden können, die antiarthritische Substanz zu produzieren. Da ein großer Teil derartiger Substanzen antiinflammatorisch wirken, würden die Immun- und Entzündungsreaktionen in den Gelenken gehemmt sein, unabhängig, ob die chronische Arthritis sich in einer Ruhephase oder aber in einem akuten Erkrankungsschub befindet. Durch die lokale Hemmung der Immunreaktion begünstigt und durch die kausalen Faktoren der chronischen Arthritis bewirkt, wäre das Risiko eine gesteigerte pathologische Immun- und Entzündungsreaktion nach Abklingen der Wirksamkeit der antiarthritisch wirkenden Substanzen, jedoch keine weitgehende Linderung oder Heilung der Arthritis.

Es besteht somit ein dringender Bedarf nach neuen therapeutischen Verfahren oder Wirkstoffen,

- welche je nach Anzahl und Schwere der chronisch entzündeten Gelenke einem Patienten lokal oder systemisch gegeben werden können
- deren Wirkung vorzugsweise wenn nicht ausschließlich auf aktivierte und proliferierende Synovialzellen oder auch Entzündungszellen beschränkt bleibt

- deren Wirkungen vorzugsweise in der längerfristigen Prophylaxe und Therapie des akuten Entzündungsschubes bestehen.

### 3) Leukämien und Lymphome

Patienten mit Tumoren des blutbildenden Systems, welche nach einer vorübergehend erfolgreichen Chemotherapie ein Rezidiv erleiden, haben eine relativ schlechte Prognose (Hiddemann et al., Blood Rev. 8, 225 (1994)). Demzufolge wurden verschiedene intensive Behandlungsstrategien entwickelt, um die Überlebenszeit zu verlängern.

Hierzu gehören unterschiedliche Kombinationen von Zytostatika (The Medica Letter 31, 49 (1989)), wie auch die Knochenmarktransplantation (De Magalhaes-Silverman et al., Cell Transplant. 2, 75 (1993)). Beide Therapieansätze sind jedoch nur begrenzt wirksam (Sloane et al., Histopathol. 22 201 (1993)). Es besteht somit weiterhin ein erheblicher medizinischer Bedarf nach neuen, wirksamen Therapeutika für Tumoren des blutbildenden Systems.

Tumorzellen des blutbildenden Systems besitzen je nach Typ des Tumors ausgeprägte molekularbiologische Veränderungen (Übersicht bei Lotter et al., Cancer Surveys 16, 157 (1993), Yunis et al., Crit. Rev. Onc. 4, 161 (1993)). Besonders ausgeprägt sind hierbei beispielsweise

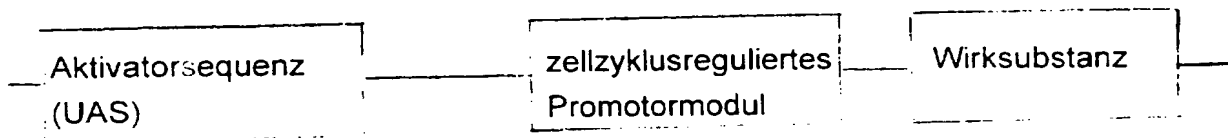
- Burkitt's lymphome (BL)
- Deregulierung von c-myc mit exzessiver c-myc-mRNA und c-myc-Proteinproduktion (Mc Keithan, Seminars in Oncol. 17, 30 (1990))
  - Überexpression von bcl-2 (Tsujiimoto et al., PNAS 86, 1958 (1989))
- B-Zell-Leukämien und lymphome (BCL)
- Überexpression von bcl-2 (in 85% der Patienten mit follikulärem Lymphom und 25% der Patienten mit diffussem Lymphom) (Yunis et al., New Engl. J. Med. 316, 79 (1987))
  - Überexpression von bcl-1 in Patienten mit zentrozytischem Lymphom (Seto et al., Oncogene 7, 1401 (1992))
  - Überexpression von IL-6 (Lewis et al., Nature 317, 544 (1985))
  - Überexpression von IL-10 (Levine, Blood 80, 8 (1992))
- akute B-Zell-Leukämie (aBCL)
- Expression des Fusionsproteins E2A-PBX-1 (Yunis et al., Crit. Rev. Onco. 4, 161 (1993))
- T-Zell-Lymphome (TCL)
- Überexpression von c-myc (Cotter, Cancer Surveys 16, 157 (1993))
  - Überexpression von HOX11 (syn. TCL3) (Hatano et al., Science 253, 79 (1991))
- chronische myeloische Leukämie (CML)
- Expression des Fusionsproteins BCR-Abl (Daley et al., PNAS 88, 11335 (1991))
- akute lymphatische Leukämie (ALL)
- Überexpression von IL-3 (Mecker et al., Blood 76, 285 (1990))
- akute myeloische Leukämie (AML)
- Expression des Fusionsproteins PML/RARA (Alcalay et al., PNAS 89, 4840 (1992), Pandolfi et al., EMBO J. 11, 1397 (1992))

Bislang konnten diese molekularbiologischen Veränderungen jedoch noch nicht für klinische Therapieverfahren genutzt werden.

#### 4) Allgemeine Beschreibung der Erfindung

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist nunmehr ein Wirkstoff (d. h. ein Arzneimittel), welcher lokal wie auch systemisch Patienten gegeben werden kann und welcher eine zellspezifische, zellzyklusregulierte Bildung von Wirksubstanzen zur Therapie von Erkrankungen des Immunsystems bewirkt.

Wesentlicher Bestandteil des Wirkstoffes ist ein DNA-Konstrukt folgender Zusammensetzung



(DNA wird im gesamten Text dieser Anmeldung als gemeinsamer Begriff sowohl für eine komplementäre (cDNA) wie auch für eine genomische DNA-Sequenz benutzt).

##### 4.1. Beschreibung des Promotormoduls

Das zentrale Element des erfindungsgemäßen Wirkstoffes stellt ein zellzyklusreguliertes Promotormodul dar.

Als zellzyklusreguliertes Promotormodul ist beispielsweise die Nukleotidsequenz -CDE-CHR-Inr- (siehe unten) zu verstehen. Die wesentliche Funktion des Promotormodule ist die Hemmung der Funktion der Aktivatorsequenz in der G0/G1 Phase des Zellzyklus und eine Zellzyklus-spezifische Expression in der S/G2 Phase und damit in proliferierenden Zellen.

Das Promotormodul CDE-CHR-Inr wurde im Rahmen einer detaillierten Untersuchung der G2-spezifischen Expression des menschlichen cdc25C Promotors entdeckt. Ausgangspunkt war die Auffindung eines Repressorelementes ("cell cycle dependent element"; CDE), das für die Abschaltung des Promotors in der G1-Phase des Zellzyklus verantwortlich ist (Lucibello et al., EMBO J. 14, 132 (1995)). Durch genomisches Dimethylsulfat (DMS)-Footprinting und funktionelle Analysen (Fig. 1, 2) konnte gezeigt

werden, daß das CDE einen Repressor ("CDE-binding factor"; CDF) G1-spezifisch bindet und hierdurch zu einer Inhibition der Transkription in nicht-proliferierenden (G0) Zellen führt. Das im Bereich des Basalpromotors lokalisierte CDE ist in seiner reprimierenden Funktion abhängig von einer "upstream activating sequence" (UAS). Dies führte zu dem Schluß, daß der CDE-bindende Faktor die transkriptionsaktivierende Wirkung 5' gebundener Aktivatorproteine in einer zellzyklusabhängigen Weise, d.h. in nicht-proliferierenden Zellen sowie in der G1-Phase des Zellzyklus, hemmt (Fig. 3).

Diese Schlußfolgerung konnte durch ein weiteres Experiment bestätigt werden: Die Fusion des viralen, nicht-zellzyklusregulierten frühen SV40-Enhancers mit einem cdc25 Minimalpromotor (bestehend aus CDE und den 3' gelegenen Startstellen) führte zu einer klaren Zellzyklusregulation des chimären Promotors (Fig. 4). Nachfolgende Untersuchungen des cdc25C Enhancers haben gezeigt, daß es sich bei den vom CDF zellzyklusabhängig regulierten Transkriptionsfaktoren um NF-Y (CBF) (Dorn et al., Cell 50, 863 (1987), van Huijsduijnen et al., EMBO J. 9, 3119 (1990), Coustry et al., J. Biol. Chem. 270, 468 (1995)), Sp1 (Kadonaga et al., TIBS 11, 10 (1986) und einen möglicherweise neuen an CBS7 bindenden Transkriptionsfaktor (CIF) handelt. Ein weiterer interessanter Befund dieser Studie war die Beobachtung, daß NF-Y innerhalb des cdc25C Enhancers nur in Kooperation mit mindestens einem weiteren NF-Y Komplex oder mit CIF effizient die Transkription aktiviert. Sowohl NF-Y als auch Sp1 gehören zur Klasse der glutaminreichen Aktivatoren, was wichtige Hinweise auf den Mechanismus der Repression (z.B. Interaktion bzw. Interferenz mit bestimmten basalen Transkriptionsfaktoren oder TAFs) liefert.

Ein Vergleich der Promotorsequenzen von cdc25C, cyclin A und cdc2 zeigte Homologien in mehreren Bereichen (Fig. 5). Nicht nur das CDE ist in allen 3 Promotoren konserviert (die vorhandenen Abweichungen sind funktionell nicht relevant), sondern auch die benachbarten Y-Boxen. Alle diese Bereiche zeigten wie erwartet Proteinbindung in vivo, im Falle des CDE in zellzyklusabhängiger Weise. Außerdem konnte gezeigt werden, daß alle 3 Promotoren durch eine Mutation des CDE dereguliert werden (Tabelle 1). Eine bemerkenswerte Ähnlichkeit wurde bei dem Vergleich der cdc25C, cyclin A und cdc2 Sequenzen auch im Bereich unmittelbar 3' vom CDE ("cell cycle genes

homology region"; CHR) deutlich (Fig. 5). Dieser Bereich ist funktionell ebenso bedeutsam wie das CDE (Tabelle 1), wird in den in vivo DMS Footprinting Experimenten jedoch nicht sichtbar. Eine mögliche Erklärung hierfür ist eine Interaktion des Faktors mit der kleinen Furche der DNA. Ergebnisse aus "electrophoretic mobility shift assay" (EMSA) Experimenten deuten darauf hin, daß CDE und CHR gemeinsam einen Proteinkomplex, den CDF, binden. Diese Beobachtungen weisen darauf hin, daß die CDF-vermittelte Repression glutaminreicher Aktivatoren ein häufig vorkommender Mechanismus zellzyklusregulierter Transkription ist.

Von Bedeutung für die Regulation des cdc25C Promotors ist jedoch anscheinend nicht nur der CDE-CHR-Bereich, sondern auch eine der Initiationsstellen (Position +1) innerhalb der Nukleotidsequenz des basalen Promotors (Positionen  $\leq -20$  bis  $\geq +30$ , siehe Fig. 1). Mutationen in diesem Bereich, der die in vitro Bindestelle für YY-1 (Seto und Shenk, Nature **354**, 241 (1991), Usheva und Shenk, Cell **76**, 1115 (1994)) einschließt, führen zu einer völligen Deregulation. In Anbetracht der Nähe des CDE-CHR zum basalen Promotor ist somit eine Interaktion des CDF mit dem basalen Transkriptionskomplex sehr wahrscheinlich.

#### 4.2. Beschreibung der Aktivatorsequenz

Als Aktivatorsequenz (UAS = upstream activator sequence) ist eine Nukleotidsequenz (Promotor- oder Enhancersequenz) zu verstehen, mit der Transkriptionsfaktoren, gebildet oder aktiv in der Zielzelle, interagieren. Als Aktivatorsequenz kann der CMV-Enhancer, der CMV-Promotor (EP 0173.177.B1), der SV40 Promotor oder jede andere, dem Fachmann bekannte Promotor- oder Enhancersequenz verwendet werden.

Im Sinne dieser Erfindung zählen zu den bevorzugten Aktivatorsequenzen jedoch genregulatorische Sequenzen bzw. Elemente aus Genen, die besonders in Zellen des blutbildenden Systems, in aktivierten Lymphozyten, in aktivierten Synovialzellen oder Makrophagen, in virusinfizierten Zellen oder in Leukämiezellen gebildete Proteine kodieren.

#### 4.3. Beschreibung der Wirksubstanz

Als Wirksubstanz ist die DNA für ein Protein zu verstehen, welches am Ort der Entstehung den therapeutischen Effekt, d.h. die Behebung der Erkrankung des Immunsystems, bewirken soll. Die Auswahl der Nukleotidsequenz für die Aktivatorsequenz und für die Wirksubstanz richtet sich nach der Zielzelle und der gewünschten Wirksubstanz.

#### 4.4. Herstellung des Plasmids oder Vektors

Das erfindungsgemäße DNA-Konstrukt wird in einer dem Fachmann geläufigen Weise zu einem Vektor vervollständigt; so wird es beispielsweise in einen viralen Vektor eingefügt (siehe hierzu D. Jolly, Cancer Gene Therapy 1, 51 (1994)), oder als Plasmid verwendet. Virale Vektoren oder Plasmide können mit kolloidalen Dispersionen komplexiert werden, so beispielsweise mit Liposomen (Farhood et al., Annals of the New York Academy of Sciences 716, 23 (1994)) oder aber mit einem Polylysin-Ligand-Konjugaten (Curiel et al., Annals of the New York Academy of Sciences 716, 36 (1994)).

#### 4.5. Ergänzung durch einen Liganden

Derartige virale oder nicht-virale Vektoren können durch einen Liganden ergänzt werden, welcher Bindungsaffinität für eine Membranstruktur auf der ausgewählten Zielzelle hat. Die Auswahl des Liganden richtet sich somit nach der Auswahl der Zielzelle.

Der erfindungsgemäße Wirkstoff wird in folgenden Beispielen näher beschrieben:

### 5) Wirkstoff zur Behebung der mangelhaften Bildung von Zellen des Blutes

#### 5.1. Auswahl der Aktivatorsequenz für blutbildende Zellen

Im Sinne der vorliegenden Erfindung wird als Aktivatorsequenz bevorzugt eine genregulatorische Sequenz bzw. ein Element aus einem Gen verwendet, welches ein Protein kodiert, welches besonders stark oder

selektiv in Zellen der Blutbildung exprimiert ist. Zu solchen genregulatorischen Sequenzen gehören Promotorsequenzen für Gene eines Cytokins oder seines Rezeptors, dessen Expression in den unreifen blutbildenden Zellen (oder in benachbarten Zellen, wie beispielsweise dem Stroma), dem nachfolgenden, auf die blutbildenden Zellen einwirkenden und als Wirksubstanz gewünschten Cytokin vorgeschaltet ist. Beispielsweise sind derartige auf unreife blutbildende Zellen einwirkende Cytokine

- \* Stem Cell Factor (Martin et al., Cell 63, 203 (1990)) vorgeschaltet allen haematopoietischen Faktoren (McNiece et al., Exp. Hematol. 19, 226 (1991))
- \* IL-1 (Durum et al., Ann. Rev. Immunol. 3, 263 (1985))
- \* IL-3 (Clark-Lewis et al., J. Biol. Chem. 259, 7488 (1984), Oster et al., Int. J. Cell Clon. 9, 5 (1991))
- \* IL-6 (Mizel, FASEB J. 3, 2379 (1989))
- \* GM-CSF (Gasson, Blood 6, 1131 (1991), Dunlop et al., AntiCancer Drugs 2, 327 (1991))

Die Promotorsequenzen für diese Cytokine und ihre Rezeptoren sind durch folgende Arbeiten zugänglich:

- \* Stem Cell Factor-Receptor
- \* (Yamamoto et al., Jap. J. Cancer Res. 84, 1136 (1993))
- \* Stem Cell Factor
- \* (Szcylik et al., J. Exp. Med. 178, 997 (1993), Bowen et al., Leukemia 7, 1883 (1993), Yamamoto et al., Jp. J. Cancer Res. 84, 11 (1993))
- \* IL-1 $\alpha$
- \* (Hangen et al., Mol. Carcinog. 2, 68 (1986), Turner et al., J. Immunol. 143, 3556 (1989), Mori et al., Blood 84, 1688 (1994))
- \* IL-1-Rezeptor
- \* (Ye et al., PNAS USA 90, 2295 (1993))
- \* IL-3
- \* (Mathey-Prevot et al., PNAS USA 87, 5046 (1990), Cameron et al., Blood 83, 2851 (1994), Arai et al., Lymphokine Res. 9, 551 (1990))
- \* IL-3-Rezeptor ( $\alpha$ -subunit)
- \* (Miyajima et al., Blood 85, 1246 (1995), Rapaport et al., Gene 137, 333



- (1993), Kosugi et al., BBRC 208, 360 (1995))
- \* IL-3-Rezeptor ( $\beta$ -subunit)
  - \* (Gorman et al., J. Biol. Chem. 267, 15842 (1992), Kitamura et al., Cell 66, 1165 (1991), Hayashida et al., PNAS USA 87, 9655 (1990))
  - \* IL-6
  - \* (Yukasawa et al., EMBO J. 6, 2939 (1987), Lu et al., J. Biol. Chem. 270, 9748 (1995), Ray et al., PNAS 85, 6701 (1988), Droogmans et al., DNA-Sequence 3, 115 (1992), Mori et al., Blood 84, 2904 (1994), Liberman et al., Mol Cell. Biol. 10, 2327 (1990), Ishiki et al., Mol. Cell. Biol. 10, 2757 (1990), Gruss et al., Blood 80, 2563 (1992))
  - \* IL-6-Rezeptor
  - \* (Yamasaki et al., Science 241, 825 (1988), Mullberg et al., J. Immunol. 152, 4958 (1994))
  - \* GM-CSF
  - \* (Nimer et al., Mol. Cell Biol. 10, 6084 (1990), Staynow et al., PNAS USA 92, 3606 (1995), Koyano-Nakayawa et al., Int. Immunol. 5, 345 (1993), Ye et al., Nucl. Acids Res. 22, 5672 (1994))
  - \* GM-CSF-Rezeptor ( $\alpha$ -Kette)
  - \* (Nakagawa et al., J. Biol. Chem. 269, 10905 (1994))
  - \* Interferon Regulatory Factor 1 (IRF-1)
  - \* Der Promotor von IRF-1 wird durch IL-6 gleichermaßen aktiviert wie durch IFN- $\gamma$  oder IFN $\beta$ .
  - \* (Harrock et al., EMBO J. 13, 1942 (1994)).

## 5.2. Auswahl der Wirksubstanz für blutbildende Zellen

Als Wirksubstanz im Sinne der Erfindung ist eine DNA-Sequenz zu verstehen, deren exprimiertes Protein die Proliferation und/ oder Differenzierung von Blutzellen bewirkt.

Je nach Typ der Blutzellarmut sind beispielsweise folgende Wirksubstanzen zu wählen:

- 16 -

Wirksubstanz für die Anämie:

DNA-Sequenz für Erythropoietin

(Jacobs et al., Nature 313, 806 (1985), Lin et al., PNAS 82, 7580 (1985), Krantz, Blood 77, 419 (1991), Dube et al., J. Biol. Chem. 263, 17516 (1988))

Wirksubstanz für die  
Leukopenie:

DNA-Sequenz für G-CSF

(Nagata et al., EMBO J. 5, 575 (1986), Nagata et al., Nature 319, 415 (1986), Souza et al., Science 232, 61 (1986))

oder für GM-CSF

(Gough et al., Nature 309, 763 (1984), Nicola et al., J. Biol. Chem. 254, 5290 (1979), Wong et al., Science 228, 810 (1985))

Wirksubstanz für die  
Thrombozytopenie:

DNA für IL-3

(Yang et al., Cell 47, 3 (1986))

DNA für Leukemia Inhibitory Factor (LIF)

(Metcalf, Int. J. Cell Clon. 9, 85 (1991), Sutherland et al., Leuk. 3, 9 (1989), Gough et al., PNAS USA 85, 2623 (1988), Gough et al., Ciba Found. Symp. 167, 24 (1992), Stahl et al., J. Biol. Chem. 265, 8833 (1990), Rathjan et al., Cell 62, 1105 (1990))

DNA-Sequenz für IL-11

(Kawashima et al., FEBS Lett. 283, 199 (1991), Paul et al., PNAS 87, 7512 (1990))

und/oder

DNA für Thrombopoietin

(de Sauvage et al., Nature 369, 533 (1994), Kaushansky et al., Nature 369, 568 (1994), Wendling et al., Nature 369, 571 (1994))

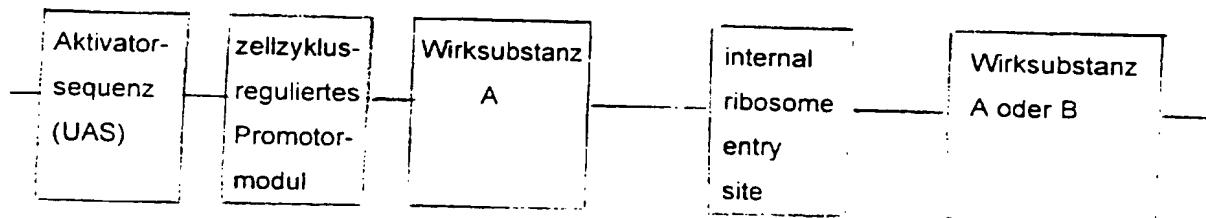
Als Wirksubstanz im Sinne der Erfindung können jedoch auch DNA-Sequenzen von Fusionsproteinen zwischen den aufgeführten Cytokinen, Wachstumsfaktoren oder dem extrazellulären Teil der Rezeptoren zum einen und dem Fc-Teil des menschlichen Immunglobulins zum anderen Verwendung finden. Derartige DNA-Sequenzen und ihre Herstellung wurden in der EPA 0464 633 A1 beschrieben.

### 5.3. Kombination von gleichen oder unterschiedlichen Wirksubstanzen für blutbildende Zellen

Gegenstand der Erfindung ist des weiteren ein Wirkstoff, in welchem eine Kombination der DNA-Sequenzen von mehreren gleichen Wirksubstanzen (A,A) oder unterschiedlichen Wirksubstanzen (A,B) vorliegt. Zur Expression zweier DNA-Sequenzen ist vorzugsweise die cDNA einer "internal ribosome entry site" (IRES) als regulatorisches Element zwischengeschaltet.

Derartige IRES wurden beispielsweise von Montford und Smith (TIG 11, 179 (1995), Kaufman et al., Nucl. Acids Res. 19, 4485 (1991), Morgan et al., Nucl. Acids Res. 20, 1293 (1992), Dirks et al., Gene 128, 247 (1993), Pelletier und Sonenberg, Nature 334, 320 (1988) und Sugitomo et al., BioTechn. 12, 694 (1994) beschrieben.

So kann die die cDNA der IRES-Sequenz des Poliovirus (Position  $\leq 140$  bis  $\geq 630$  des 5' UTR (Pelletier und Sonenberg, Nature 334, 320 (1988)) zur Verknüpfung der DNA der antientzündlichen Substanz A (am 3' Ende) und der DNA der antientzündlichen Substanz B (am 5' Terminus) verwendet werden.



Ein derartiger Wirkstoff weist je nach Kombination additive (A+A, A+B) oder synergistische (A+B) Wirkung auf.

#### 5.4. Auswahl des Liganden für blutbildende Zellen

Ziel sollte sein, den Wirkstoff zu der Zielzelle oder zu Zellen benachbart der Zielzelle zu bringen. Hierzu können virale oder nicht-virale Vektoren mit einem Liganden versehen werden. Der Ligand sollte vorzugsweise mit Membranstrukturen oder Membranrezeptoren auf undifferenzierte oder gering differenzierte Blutzellen binden.

Zu den Liganden gehören Antikörper oder Antikörperfragmente, gerichtet gegen Rezeptoren exprimiert auf gering differenzierten Blutzellen.

Derartige Antikörper sind beispielsweise für folgende Rezeptoren beschrieben worden:

- Stem Cell Factor Receptor
- (Blechman et al., Cell 80, 103 (1995), Oez et al., Eur. Cytokine Netw. 4, 293 (1993))
- IL-1-Rezeptor (Type I)
- (McMahan et al., EMBO J. 10, 2821 (1991), Giri et al., Cytokine 4, 18 (1992),
- IL-1-Rezeptor (Type II)
- (Scapigliati et al., J. Immunol. Methods 138, 31 (1991))
- IL-3-Rezeptor  $\alpha$
- (Sato et al., Blood 82, 752 (1993))
- IL-3-Rezeptor  $\beta$
- (Korpeilainen et al., Blood 86, 176 (1995))
- IL-6-Rezeptor
- (Daveau et al., Eur. Cytokine Netw. 5, 601 (1994), Sui et al., PNAS USA 92, 2859 (1995), Goto et al., Jpn. J. Cancer Res. 85, 958 (1994))
- GM-CSF-Rezeptor
- (Nicola et al., Blood 82, 1724 (1993))

Desweiteren gehören zu den Liganden auch monoklonale oder polyklonale Antikörper oder Antikörperfragmente, die mit ihren konstanten Domänen an Fc- $\gamma$  Rezeptoren von Immunzellen binden (Rojanasakul et al., Pharm. Res. 11, 1731 (1994)).

Die murinen monoklonalen Antikörper sind bevorzugt in humanisierter Form einzusetzen. Die Humanisierung erfolgt in der von Winter et al. (Nature 349, 293 (1991)) und Hoogenbooms et al. (Rev. Tr. Transfus. Haemobiol. 36, 19 (1993)) dargestellten Weise. Antikörperfragmente werden entsprechend dem Stand der Technik hergestellt, beispielsweise in der von Winter et al. (Nature 349, 293 (1991)), Hoogenboom et al. (Rev. Tr. Transfus. Hemobiol. 36, 19 (1993)), Girol (Mol. Immunol. 28, 1379 (1991)) und Huston et al. (Int. Rev. Immunol. 10, 195 (1993)) beschriebenen Weise.

Zu den Liganden gehören des weiteren alle Substanzen, welche an Membranstrukturen oder Membranrezeptoren auf der Oberfläche von gering differenzierten Blutzellen Zellen binden. Beispielsweise gehören hierzu Wachstumsfaktoren, wie SCF, IL-1, IL-3, IL-6, GM-CSF oder deren Fragmente bzw. Teilsequenzen von ihnen, die an Rezeptoren exprimiert durch derartige Zellen binden.

### **5.5. Herstellung des Wirkstoffes für blutbildende Zellen**

Die Herstellung des erfindungsgemäßen Wirkstoffes wird anhand folgender Beispiele näher beschrieben:

#### **a) Konstruktion des chimären Promotors SCF-Rezeptor-CDE-CHR-Inr**

Der humane SCF-Rezeptor Promotor (Position  $\leq -180$  bis  $\geq -22$ , Yamamoto et al., Jpn. J. Cancer Res. 84, 1136 (1993)) oder eine um die TATA-Box verkürzte Variante (Position  $\leq -180$  bis  $\geq -65$ ) werden an ihrem 3' Ende mit dem 5'-Terminus des CDE-CHR-Inr Moduls (Position  $\leq -20$  bis  $\geq +121$ ) des humanen cdc25C-Gens (Lucibello et al., EMBO J., 14, 132 (1995)) verknüpft (Fig. 6). Die Verknüpfung erfolgt mit Hilfe von dem Fachmann bekannten und käuflichen Enzymen.

#### **b) Konstruktion eines Plasmids enthaltend den chimären Promotor SCF-Rezeptor-CDE-CHR-Inr im zentralen Bestandteil des Wirkstoffes**

Die beschriebene chimäre SCF-Rezeptor-Repressormodul-Transkriptionseinheit wird an ihren 3' Enden mit dem 5'-Terminus einer DNA, die den

kompletten kodierenden Bereich des Thrombopoietin (Position  $\leq 216$  bis  $\geq 1277$ , (de Sauvage et al., Nature **369**, 533 (1994)) enthält, verknüpft (Fig. 6). Diese DNA enthält auch die für eine Sekretion notwendige Signalsequenz. Transkriptionskontrolleneinheiten und die DNA für Thrombopoietin werden in pUC19/19 oder Bluescript-abgeleiteten Plasmidvektoren einkloniert, die direkt oder in kolloidalen Dispersions-systemen für eine in vivo Applikation genutzt werden können. Alternativ können die chimären Gene in virale Vektoren oder andere geeignete Vektoren transferiert und injiziert werden.

c) Konstruktion des chimären Promotors IL-1-Rezeptor-CDE-CHR-Inr

Der humane IL-1-Rezeptor Promotor (Pos.  $\leq -489$  bis  $\geq -1$ , Ye et al., PNAS USA **30**, 2295 (1993)) wird an seinem 3' Ende mit dem 5'-Terminus des CDE-CHR-Inr Moduls des humanen cdc25C-Gens (Pos.  $\leq -20$  bis  $\geq +121$ , der von Lucibello et al., EMBO J. **14**, 132 (1995) publizierte Sequenz) verknüpft (siehe Fig. 6). Die Verknüpfung erfolgt mit Hilfe von dem Fachmann bekannten und käuflichen Enzymen.

d) Konstruktion eines Plasmids enthaltend den chimären Promotor IL-1-Rezeptor-CDE-CHR-Inr im zentralen Bestandteil des Wirkstoffes

Die unter c) beschriebene chimäre IL-1-Rezeptor-Repressormodul-Transkriptionskontrolleneinheit wird an ihrem 3' Ende mit dem 5'-Terminus einer DNA, die den kompletten kodierenden Bereich des Thrombopoietins enthält, verknüpft (siehe Fig. 6). Diese DNA enthält auch die für eine Sekretion notwendige Signalsequenz. Transkriptionskontrolleneinheiten und die DNA für den Tissue Plasminogen Activator werden in pUC18/19 oder Bluescript-abgeleiteten Plasmidvektoren einkloniert, die direkt oder in kolloidalen Dispersionssystemen für eine in vivo Applikation genutzt werden können. Alternativ können die chimären Gene in virale Vektoren oder andere geeignete Vektoren transferiert und injiziert werden.

e) Konstruktion eines Plasmids enthaltend zwei Gene für Wirksubstanzen

Die unter a) geschilderte SCF-Rezeptor-CDE-CHR-Inr-Transkriptionsein-

heit wird an ihrem 3' Ende mit dem 5' Ende der DNA für das Interleukin-3 (Position  $\leq 10$  bis  $\geq 468$ , Yang et al., Cell 47, 3 (1986)) verknüpft. Die Verknüpfung erfolgt mit Hilfe von dem Fachmann bekannten und käuflichen Enzymen.

Das 3' Ende der DNA für IL-3 wird nunmehr verknüpft mit dem 5' Ende der cDNA der internal ribosome entry site (Position  $\leq 140$  bis  $\geq 630$ ; Pelletier und Sonnenberg, Nature 334, 320 (1988)) und anschließend wird deren 3' Ende mit dem 5' Ende der DNA für das Thrombopoietin verknüpft (siehe Fig. 6). Dieser so hergestellte Wirkstoff wird anschließend in puc18/19 oder in Bluescript-abgeleiteten Plasmidvektoren einkloniert, die direkt oder in kolloidalen Dispersionssystemen für eine in vivo Applikation genutzt werden können. Alternativ können die chimären Gene in virale Vektoren oder andere geeignete Vektoren transferiert und injiziert werden.

f) Konstruktion weiterer Transkriptionseinheiten

Die Möglichkeit der Kombination des IL-3-Rezeptor ( $\alpha$ -Kette) Promotors, GM-CSF-Rezeptor ( $\alpha$ -Kette) Promotors oder des GM-CSF-Rezeptor ( $\beta$ -Kette) Promotors mit dem Repressormodul CDE-CHR-Inr und den bereits erwähnten Effektorgenen ist in Fig. 6 dargestellt.

6. Wirkstoff zur Therapie von Autoimmunerkrankungen, Allergien, Entzündungen und zur Verhütung von Organabstoßungen

**6.1. Auswahl der Aktivatorsequenz für Autoimmunerkrankungen u.a.**

Als Aktivatorsequenzen sind die Promotorsequenzen der Gene für solche Proteine zu verwenden, welche bei der Immunreaktion in Makrophagen und/oder in Lymphozyten verstärkt gebildet werden. Derartige Proteine sind beispielsweise

- \* IL-1 (Bensi et al., Gene 52, 95 (1987), Fibbe et al., Blut 59, 147 (1989))
- \* IL-1-Rezeptor (Colotta et al., Immunol. Today 15, 562 (1994), Sims et al., Clin. Immunol. Immunopath. 72, 9 (1994), Ye et al., PNAS USA 90, 2295 (1993))

- 22 -

- \* IL-2 (Jansen et al. CII 39, 207 (1994), Ohbo et al., J. Biol. Chem. 270, 7479 (1995))
- \* IL-2-Rezeptor (Semenzato et al., Int. J. Clin Lab. Res. 22, 133 (1992))
- \* IFN  $\gamma$  (Kirchner, DMW 111, 64 (1986), Lehmann et al., J. Immunol. 153, 165 (1994))
- \* IL-4 (Paul, Blood 77, 1859 (1991), te Velde et al., Blood 76, 1392 (1990))
- \* IL-4-Rezeptor (Vallenga et al., Leukemia 7, 1131 (1993), Galizzi et al., Int. Immunol. 2, 669 (1990))
- \* IL-3 (Freundl, Int. J. Immunopharm. 14, 421 (1992))
- \* IL-5 (Azuma et al., Nucl. Acid Res. 14, 9149 (1986), Yokota et al., PNAS 84, 7388 (1987))
- \* IL-6 (Brack et al., Int. J. Clin. Lab. Res. 22, 143 (1992))
- \* LIF (Metcalf, Int. J. Cell Clon. 9, 95 (1991), Samal, BBA 1260, 27 (1995))
- \* IL-7 (Joshi et al., 21, 681 (1991))
- \* IL-10 (Benjamin et al., Leuk. Lymph. 12, 205 (1994), Fluchiger et al., J. Exp. Med. 179, 91 (1994))
- \* IL-11 (Yang et al., Biofactors 4, 15 (1992))
- \* IL-12 (Kiniwa et al., J. Clin. Invest. 90, 262 (1992), Gatelay, Cancer Invest. 11, 500 (1993))
- \* IL-13 (Punnonen et al., PNAS 90, 3730 (1993), Muzio et al., Blood 83, 1738 (1994))
- \* GM-CSF (Metcalf, Cancer 15, 2185 (1990))
- \* GM-CSF-Rezeptor  
(Nakagawa et al., J. Biol. Chem. 269, 10905 (1994))
- \* Integrin beta 2 proteins (LFA-1, MAC-1, p150/95) (Nueda et al., J. Biol. Chem. 268, 19305 (1993))

Promotorsequenzen für diese Proteine wurden wie folgt beschrieben

- \* IL-1-Rezeptor  
(Ye et al., PNAS USA 90, 2295 (1993))
- \* IL-1 $\alpha$   
(Hangen et al., Mol. Carcinog. 2, 68 (1986), Turner et al., J. Immunol. 143, 3556 (1989), Mori et al., Blood 84, 1688 (1994))
- \* IL-1 $\beta$   
(Fenton et al., J. Immunol. 138, 3972 (1987), Bensi et al., Cell Growth Diff.



- 1, 491 (1990), Turner et al., J. Immunol. 143, 3556 (1989), Hiscott et al., Mol. Cell. Biol. 13, 6231 (1993))
- \* IL-2  
(Fujita et al., Cell 46, 401 (1986), Hama et al., J. Exp. Med. 181, 1217 (1995), Kant et al., Lymph. Rec. Interact. 179 (1989), Kamps et al., Mol. Cell. Biol. 10, 5464 (1990), Williams et al., J. Immunol. 141, 662 (1988), Brunvand, FASEB J. 6, A998 (1992), Matsui et al., Lymphokines 12, 1 (1985), Tanaguchi et al., Nature 302, 305 (1983))
  - \* IL-2-Rezeptor  
(Ohbo et al., J. Biol. Chem. 270, 7479 (1995), Shibuya et al., Nucl. Acids Res. 18, 3697 (1990), Lin et al., Mol. Cell. Biol. 13, 6201 (1993), Semenzato et al., Int. J. Clin. Lab. Res. 22, 133 (1992))
  - \* IL-3  
(Mathey-Prevot et al., PNAS USA 87, 5046 (1990), Cameron et al., Blood 83, 2851 (1994), Arai et al., Lymphokine Res. 9, 551 (1990))
  - \* IL-3-Rezeptor ( $\alpha$ -subunit)  
(Miyajima et al., Blood 85, 1246 (1995), Rapaport et al., Gene 137, 333 (1993), Kosugi et al., BBRC 208, 360 (1995))
  - \* IL-3-Rezeptor ( $\beta$ -subunit)  
(Gorman et al., J. Biol. Chem. 267, 15842 (1992), Kitamura et al., Cell 66, 1165 (1991), Hayashida et al., PNAS USA 87, 9655 (1990))
  - \* IL-4  
(Rooney et al., EMBO J. 13, 625 (1994), Hama et al., J. Exp. Med. 181, 1217 (1995), Li-Weber et al., J. Immunol. 153, 4122 (1994), 148, 1913 (1992), Min et al., J. Immunol. 148, 1913 (1992), Abe et al., PNAS 89, 2864 (1992))
  - \* IL-4-Rezeptor  
(Beckmann et al., Chem. Immunol. 51, 107 (1992), Ohara et al., PNAS 85, 8221 (1988))
  - \* IL-5  
(Lee et al., J. Allerg. Clin. Immunol. 94, 594 (1994), Kauhansky et al., J. Immunol. 152, 1812 (1994), Staynov et al., PNAS USA 92, 3606 (1995))
  - \* IL-6  
(Lu et al., J. Biol. Chem. 270, 9748 (1995), Gruss et al., Blood 80, 2563 (1992), Ray et al., PNAS 85, 6701 (1988), Droogmans et al., DNA-Sequence 3, 115 (1992), Mori et al., Blood 84, 2904 (1994), Liberman et

- al., Mol Cell. Biol. 10, 2327 (1990), Ishiki et al., Mol. Cell. Biol. 10, 2757 (1990))
- \* Interferon Regulatory Factor 1 (IRF-1)  
(Der Promotor von IRF-1 wird durch IL-6 gleichermaßen aktiviert wie durch IFN- $\gamma$  oder IFN $\beta$ .  
(Harrock et al., EMBO J. 13, 1942 (1994))
  - \* IFN- $\gamma$  Responsive Promotor  
(Lamb et al., Blood 83, 2063 (1994))
  - \* IL-7  
(Pleiman et al., Mol. Cell. Biol. 11, 3052 (1991), Lapton et al., J. Immunol. 144, 3592 (1990))
  - \* IL-8  
(Chang et al., J. Biol. Chem. 269, 25277 (1994), Sprenger et al., J. Immunol. 153, 2524 (1994))
  - \* IL-10  
(Kim et al., J. Immunol. 148, 3618 (1992), Platzer et al., DNA Sequence 4, 399 (1994), Kube et al., Cytokine 7, 1 (1995))
  - \* IL-11  
(Yang et al., J. Biol. Chem. 269, 32732 (1994))
  - \* IFN- $\gamma$   
(Ye et al., J. Biol. Chem. 269, 25728 (1994), Hardy et al., PNAS 82, 8173 (1985))
  - \* GM-CSF  
(Nimer et al., Mol. Cell. Biol. 10, 6084 (1990), Staynov et al., PNAS USA 92, 3606 (1995), Koyano-Nakayawa et al., Int. Immunol. 5, 345 (1993), Ye et al., Nucl. Acids Res. 22, 5672 (1994))
  - \* GM-CSF-Rezeptor ( $\alpha$ -Kette)  
(Nakagawa et al., J. Biol. Chem. 269, 10905 (1994))
  - \* IL-13  
(Staynov et al., PNAS USA 92, 3606 (1995))
  - \* LIF  
(Gough et al., Ciba Found. Symp. 167, 24 (1992), Stahl et al., Cytokine 5, 386 (1993))
  - \* Makrophagen-Colony Stimulating Factor (M-CSF)-Rezeptor  
(Yue et al., Mol. Cell. Biol. 13, 3191 (1993), Zhang et al., Mol. Cell. Biol. 14, 373 (1994))

- \* Typ I und II Makrophagen Scavenger Rezeptoren  
(Moulton et al., Mol. Cell. Biol. 14, 4408 (1994))
- \* MAC-1 (Leukozytenfunktionsantigen)  
(Dziennis et al., Blood 85, 319 (1995), Bauer et al., Hum. Gene Ther. 5, 709 (1994), Hickstein et al., PNAS USA 89, 2105 (1992))
- \* LFA-1 $\alpha$  (Leukozytenfunktionsantigen)  
(Nueda et al., J. Biol. Chem. 268, 19305 (1993), Agura et al., Blood 79, 602 (1992), Cornwell et al., PNAS USA 90, 4221 (1993))
- \* p150,95 (Leukozytenfunktionsantigen)  
(Noti et al., DNA and Cell Biol. 11, 123 (1992), Lopezcabrera et al., J. Biol. Chem. 268, 1187 (1993))

Die Auflistung der Promotoren für Cytokine und Cytokinrezeptoren ist nur beispielhaft und soll nicht als Beschränkung verstanden werden.

Bei den verschiedenen Autoimmunerkrankungen kann beispielsweise folgende Promotorsequenz gewählt werden:

- |  |   |
|--|---|
| -bei Allergien:<br>Rezeptor, IL-2,                                   | die Promotorsequenzen für IL-1, IL-1-<br>IL-2-Rezeptor, IL-4 oder IL-4-Rezeptor |
| -bei Zell- oder Antikörper-<br>medierten Autoimmun-<br>erkrankungen: | die Promotorsequenzen für IL-1, IL-1-Rezeptor,<br>IL-2, IL-2-Rezeptor           |
| -zur Verhinderung der<br>Rezeptor,<br>Organabstoßung:                | die Promotorsequenzen für IL-1, IL-1-<br>IL-2, IL-2-Rezeptor                    |

## 6.2. Auswahl der Wirksubstanz für Autoimmunerkrankungen u.a.

Die Wirksubstanz im Sinne der Erfindung ist die DNA-Sequenz für ein Cytokin, ein Chemokin, einen Wachstumsfaktor oder einer ihrer Inhibitoren, einen Antikörper oder ein Enzym. Die Auswahl der Wirksubstanz richtet sich nach der zu behandelnden Grunderkrankung und der gewählten Aktivatorsequenz.

Beispielsweise kann bei folgenden Erkrankungen eine der folgenden Wirksubstanzen gewählt werden:

a) Wirksubstanz zur  
Therapie von  
Allergien

DNA-Sequenz für IFN $\alpha$  (Henco et al.,  
J. Mol. Biol. 185, 227 (1985), Pestka  
et al., Ann. Rev. Biochem. 56, 727  
(1987), Weissmann et al., Phil. Trans. R.  
Soc. Lond. B299, 7 (1982), Goeddel et al.,  
Nature 290, 20 (1981))  
oder IFN $\beta$   
(Sen et al., J. Biol. Chem. 267, 5017  
(1992), Mark et al., EP 192 811, EP 234  
599, US 45 88 585)  
oder IFN- $\gamma$   
(Gray et al., Nature 295, 503 (1982), Yip et  
al., PNAS USA 79, 1820 (1982),  
Rinderknecht et al., J. Biol. Chem. 259,  
6790 (1984))  
oder IL-10  
(Moore et al., Science 248, 1230 (1990),  
Vieira et al., PNAS USA 88, 1172 (1991),  
Kim et al., J. Immunol. 148 3618 (1992))  
oder lösliche IL-4-Rezeptoren  
(Idzerda et al., J. Exp. Med. 171, 861  
(1990), EPA 0419 091 A1, Foxwell, Eur. J.  
Immunol. 19, 1637 (1989), Garrone et al.,  
Eur. J. Immunol. 21, 1365 (1991), Gallizzi  
et al., Int. Immunol. 2, 226 (1990), Park et  
al., J. Exp. Med. 166, 476 (1987))  
oder IL-12  
(Kobayashi et al., J. Exp. Med. 170, 827  
(1989), Gabler et al., PNAS 88, 4143  
(1991), Gately et al., J. Immunol. 147, 874  
(1991), Schoenhaut et al., J. Immunol.  
148, 3433 (1992), Wolf et al., J. Immunol.  
146, 3074 (1991))

- 27 -

b) Wirksubstanz zur  
Verhinderung der  
Abstoßung von  
transplantierten  
Organen

oder TGF $\beta$

(Massague, Ann. Rev. Cell. Biol. 6, 597  
(1990), Kondiah et al., J. Biol. Chem. 265,  
1089 (1990), Garnier et al., J. Molec. Biol.  
120, 97 (1978))

DNA-Sequenz für IL-10

(Moore et al., Science 248, 1230  
(1990), Vieira et al., PNASUSA 88,  
1172 (1991), Kim et al., J. Immunol.  
148, 3618 (1992))

oder TGF $\beta$

(Massague, Ann. Rev. Cell Biol. 6, 597  
(1990), Kondiah et al., J. Biol. Chem. 265,  
1089 (1990), Garnier et al., J. Mol. Biol.  
120, 97 (1978))

oder lösliche IL-1-Rezeptoren

(Sims et al., PNAS USA 86, 8946 (1989)  
(I), Dower et al., J. Exp. Med. 162, 501  
(1985), Chizzonite et al., PNAS 86, 8029  
(1989)), McMahan et al., EMBO J. 10,  
2821 (1991) (II), Sims et al., Science 241,  
585 (1988))

oder lösliche IL-2-Rezeptoren

(Taneguchi et al., Nature 302, 305 (1983), Greene et al., Ann. Rev. Immunol. 4, 69 (1986), Hatakeyama et al., Science 244, 551 (1989), Takeshita et al., Science 257, 379 (1992), Russel et al., Science 262, 1880 (1993))

oder IL-1-Rezeptorantagonisten

(Eisenberg et al., Nature 343, 341 (1990), Carter et al., Nature 344, 633 (1990))

oder lösliche IL-6-Rezeptoren

(Mackiewicz et al., Cytokine 7, 142 (1995))

oder eine DNA-Sequenz für einen immunsuppressiven Antikörper oder dessen V<sub>H</sub> und V<sub>L</sub> enthaltende Fragmente oder dessen über einen Linker verbundene V<sub>H</sub>- und V<sub>L</sub>-Fragmente, hergestellt beispielsweise entsprechend der von Marasco et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 7889 (1993)) beschriebenen Methodik.

Immunsuppressive Antikörper sind beispielsweise Antikörper spezifisch für den T-Zell-Rezeptor oder seinen CD3-Komplex, gegen CD4 oder CD8 des weiteren gegen den IL-2-Rezeptor (Strom et al., Ann. Rev. Med. 44, 343 (1993), Scheringer et al., Ann. Hematol. 66, 181 (1993)), IL-1-Rezeptor oder IL-4-Rezeptor oder gegen die Adhäsionsmoleküle CD2, LFA-1, CD28 oder CD40 (Olive et al., Drug Carriers Syst. 10, 29 (1993), Wendling et al., J. Rheumatol. 18, 325 (1991), Van der Lubbe et al., Arthritis Rheum. 34, 89 (1991)).

- 29 -

c) Wirksubstanz zur  
Therapie von Anti-  
körper-medierten  
Autoimmunerkrankun-  
gen

DNA-Sequenz für TGF $\beta$

(Massague, Ann. Rev. Cell Biol. 6, 597  
(1990), Kondiah et al., J. Biol. Chem.  
265, 1089 (1990), Garnier et al., J.  
Molec. Biol. 120, 97 (1978))

oder IFN  $\alpha$

(Henco et al., J. Mol. Biol. 185, 227 (1985),  
Pestka et al., Ann. Rev. Biochem. 56, 727  
(1987), Weissmann et al., Phil. Trans. R.  
Soc. Lond. B299, 7 (1982), Goeddel et al.,  
Nature 290, 20 (1981), (Sen et al., J. Biol.  
Chem. 267 5017 (1992), Mark et al. EP  
192 811, EP 234 599, US 45 88 585)

oder IFN $\beta$

(Sen et al., J. Biol. Chem. 267, 5017  
(1992), Mark et al. EP 192 811, EP 234  
599, US 45 88 585)

oder IFN- $\gamma$

(Gray et al., Nature 295, 503 (1982), Yip et  
al., PNAS USA 79, 1820 (1982), Rinder-  
knecht et al., J. Biol. Chem. 259, 6790  
(1984))

oder IL-12

(Kobayashi et al., J. Exp. Med. 170, 827  
(1989), Gabler et al., PNAS 88, 4143  
(1991), Gately et al., J. Immunol. 147, 874  
(1991), Schoenhaut et al., J. Immunol.  
148, 3433 (1992), Wolf et al., J. Immunol.  
146, 3074 (1991))

oder lösliche IL-4-Rezeptoren

((Idzerda et al., J. Exp. Med. 171, 861  
(1990), EPA 0419 091 A1, Foxwell, Eur. J.  
Immunol. 19, 1637 (1989), Garrone et al.,  
Eur. J. Immunol. 21, 1365 (1991), Gallizzi  
et al., Int. Immunol. 2, 226 (1990), Park et  
al., J. Exp. Med. 166, 476 (1987))

- 30 -

oder lösliche IL-6-Rezeptoren  
 (Machiewicz et al., Cytokine 7, 142 (1995))  
 oder DNA-Sequenz für einen immunsuppressiven Antikörper (siehe Abschnitt 6.2.b) oder dessen V<sub>H</sub>- und V<sub>L</sub>-enthaltende Fragmente oder dessen über einen Linker verbundenen V<sub>H</sub>- und V<sub>L</sub>-Fragmente, hergestellt beispielsweise entsprechend der von Marasco et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 7889 (1993)) beschriebenen Methodik

d) Wirksubstanz zur  
 Therapie der Zell-  
 medierten Auto-  
 immunerkrankung

DNA-Sequenz für IL-6  
 (Wong et al., Immunol. Today 9, 137 (1988), Brakenhoff et al., J. Immunol. 143, 1175 (1989), Yasukawa et al., EMBO J. 6, 2939 (1987))  
 oder IL-9  
 (Yang et al., Blood 74, 1880 (1989), Mock et al., Immunogenetics 31, 265 (1990))  
 oder IL-10  
 (Moore et al., Science 248, 1230 (1990), Vieira et al., PNAS USA 88, 1172 (1991), Kim et al., J. Immunol. 148, 3618 (1992))  
 oder IL-13  
 (McKenzie et al., PNAS 90, 3735 (1993), Minty et al., Nature 362, 248 (1993), McKenzie et al., J. Immunol. 150, 5436 (1993))  
 oder TNF $\alpha$   
 (Beutler et al., Nature 320, 584 (1986), Kriegler et al., Cell 53, 45 (1988))  
 oder IL-4  
 (Lee et al., PNAS 83, 2061 (1986), Paul, Blood 77, 1859 (1991), Yokota et al., PNAS USA 83, 5894 (1986), von Leuven



- 31 -

et al., Blood 73, 1142 (1989), Arai et al., J. Immunol. 142, 274 (1989))

oder TNF $\beta$

(Gray et al., Nature 312, 721 (1984), Li et al., J. Immunol. 138, 4496 (1987), Aggarwal et al., J. Biol. Chem. 260, 2334 (1985)) oder

oder eine DNA-Sequenz für einen immunsuppressiven Antikörper oder dessen V<sub>H</sub>- und V<sub>L</sub>-enthaltende Fragmente dessen über einen Linker verbundene V<sub>H</sub>- und V<sub>L</sub>-Fragmente (siehe Abschnitt 6.2.b).

Bei Wahl von Rezeptoren als Wirksubstanz sind deren extrazelluläre Teile zu verwenden.

Als Wirksubstanz im Sinne der Erfindung können jedoch auch DNA-Sequenzen von Fusionsproteinen zwischen den aufgeführten Cytokinen, Wachstumsfaktoren oder dem extrazellulären Teil der jeweiligen Rezeptoren zum einen und dem Fc-Teil des menschlichen Immunglobulin zum anderen Verwendung finden. Derartige DNA-Sequenzen und ihre Herstellung wurden in der EP 0464 533 A1 beschrieben.

#### e) inhibierende Proteine

Als Wirksubstanz im Sinne der Erfindung ist jedoch auch ein Zellzyklusinhibitor zu verstehen. Ein Zellzyklusinhibitor im Sinne der Erfindung ist eine DNA-Sequenz, deren exprimiertes Protein die Proliferation von Zellen inhibiert. Zu diesen Zellzyklusinhibitoren gehören beispielsweise die DNA-Sequenzen für folgende Proteine:

- das Retinoblastomprotein (pRb=p110) oder die verwandten p107 und p130 Proteine (La Thangue, Curr. Opin. Cell Biol. 6, 443 (1994))
- das p53 Protein (Prives et al., Genes Dev. 7, 529 (1993))
- das p21 (WAF-1) Protein (El-Deiry et al., Cell 75, 817 (1993))

- das p16 Protein (Serrano et al., Nature 366, 704 (1993), Kamb et al., Science 264, 436 (1994), Nobori et al., Nature 368, 753 (1994))
- andere cdK-Inhibitoren (Übersicht bei Pines, TIBS 19, 143 (1995))
- das GADD45 Protein (Papathanasiou et al., Mol. Cell. Biol. 11, 1009 (1991), Smith et al., Science 266, 1376 (1994))
- das bak Protein (Farrow et al., Nature 374, 731 (1995), Chittenden et al., Nature 374, 733 (1995), Kiefer et al., Nature 374, 736 (1995)).

Um eine schnelle intrazelluläre Inaktivierung dieser Zellzyklusinhibitoren zu verhindern, sind bevorzugt solche Gene zu verwenden, welche Mutationen für die Inaktivierungsstellen der exprimierten Proteine aufweisen, ohne daß diese hierdurch in ihrer Funktion beeinträchtigt werden.

Das Retinoblastomprotein (pRb/p110) und die verwandten p107 und p130 Proteine werden durch Phosphorylierung inaktiviert. Bevorzugt wird somit eine pRb/p110 -, p107 - oder p130 cDNA-Sequenz verwendet, die derart punktmutiert ist, daß die Phosphorylierungsstellen des kodierten Proteins gegen nicht phosphorylierbare Aminosäuren ausgetauscht sind.

Entsprechend Hamel et al. (Mol. Cell Biol. 12, 3431 (1992) wird die cDNA-Sequenz für das Retinoblastomprotein (p110) durch Austausch der Aminosäuren in den Positionen 246, 350, 601, 605, 780, 786, 787, 800 und 804 nicht mehr phosphorylierbar, seine Bindungsaktivität mit dem großen T-Antigen wird jedoch nicht beeinträchtigt. Beispielsweise werden die Aminosäuren Thr-246, Ser-601, Ser-605, Ser-780, Ser-786, Ser-787 und Ser-800 mit Ala, die Aminosäure Thr-350 mit Arg und die Aminosäure Ser-804 mit Glu ausgetauscht.

In analoger Weise wird die DNA-Sequenz für das p107 Protein oder das p130 Protein mutiert.

Das Protein p53 wird in der Zelle inaktiviert entweder durch Bindung an spezielle Proteine, wie beispielsweise MDM2 oder durch Oligomerisierung des p53 über das dephosphorylierte C-terminale Serin 392 (Schikawa et al., Leukemia und Lymphoma 11, 21 (1993) und Brown, Annals of Oncology 4, 623 (1993)). Bevorzugt wird somit eine DNA-Sequenz für ein p53 Protein

verwendet, welches C-terminal verkürzt ist um das Serin 392.

f) zytostatische oder zytotoxische Proteine

Als Zellzyklusinhibitor ist desweiteren eine DNA-Sequenz zu verstehen, die ein zytostatisches oder zytotoxisches Protein exprimiert.

Zu derartigen Proteinen zählen beispielsweise

- Perforin (Lin et al., Immunol. Today 16, 194 (1995))
- Granzym (Smyth et al., Immunol. Today 16, 202 (1995))
- TNF (Porter, TibTech 9, 158 (1991), Sidhu et al., Pharmac. Ther. 57, 79 (1993)), im speziellen
  - \* TNF $\alpha$  (Beutler et al., Nature 320, 584 (1986), Kriegler et al., Cell 53, 45 (1988)
  - \* TNF $\beta$  (Gray et al., Nature 312, 721 (1984), Li et al., J. Immunol. 138, 4496 (1987), Aggarwal et al., J. Biol. Chem. 260, 2334 (1985)

g) Enzyme für die Aktivierung von Vorstufen von Zytostatika

Als Zellzyklusinhibitor ist jedoch auch die DNA-Sequenz für ein Enzym zu verstehen, welches eine inaktive Vorstufe eines Zytostatikums in ein Zytostatikum umwandelt.

Derartige Enzyme, welche inaktive Vorsubstanzen (Prodrugs) in aktive Zytostatika (Drugs) spalten und die jeweils zugehörigen Prodrugs und Drugs sind bereits von Deonarain et al. (Br. J. Cancer 70, 786 (1994), von Mullen, Pharmac. Ther. 63, 199 (1994) und Harris et al., Gene Ther. 1, 170 (1994)) übersichtlich beschrieben worden.

Beispielsweise ist die DNA-Sequenz folgender Enzyme zu verwenden:

- Herpes Simplex Virus Thymidinkinase  
(Garapin et al., PNAS USA 76, 3755 (1979), Vile et al., Cancer Res. 53, 3860 (1993), Wagner et al., PNAS USA 78, 1441 (1981), Moelten et al., Cancer Res. 46, 5276 (1986), J. Natl. Cancer Inst. 82, 297 (1990))

- Varizella Zoster Virus Thymidinkinase  
(Huber et al., PNAS USA 88, 8039 (1991), Snoeck, Int. J. Antimicrob. Agents 4, 211 (1994))
- bakterielle Nitroreduktase  
(Michael et al., FEMS Microbiol. Letters 124, 195 (1994), Bryant et al., J. Biol. Chem. 266, 4126 (1991), Watanabe et al., Nucleic Acids Res. 18, 1059 (1990))
- bakterielle  $\beta$ -Glucuronidase  
(Jefferson et al., PNAS USA 83, 8447 (1986))
- pflanzliche  $\beta$ -Glucuronidase aus Secale cereale  
(Schulz et al., Phytochemistry 26, 933 (1987))
- humane  $\beta$ -Glucuronidase  
(Bosslet et al., Br. J. Cancer 65, 234 (1992), Oshima et al., PNAS USA 84, 685 (1987))
- humane Carboxypeptidase (CB) z.B.
  - \* CB-A der Mastzelle  
(Reynolds et al., J. Clin. Invest. 89, 273 (1992))
  - \* CB-B des Pankreas  
(Yamamoto et al., J. Biol. Chem. 267, 2575 (1992), Catusus et al., J. Biol. Chem. 270, 6651 (1995))
- bakterielle Carboxypeptidase  
(Hamilton et al., J. Bacteriol. 174, 1626 (1992), Osterman et al., J. Protein Chem. 11, 561 (1992))
- bakterielle  $\beta$ -Laktamase  
(Rodrigues et al., Cancer Res. 55, 63 (1995), Hussain et al., J. Bacteriol. 164, 223 (1985), Coque et al., Embo J. 12, 631 (1993))
- bakterielle Cytosindeaminase  
(Mullen et al., PNAS USA 89, 33 (1992), Austin et al., Mol. Pharmac. 43, 380 (1993), Danielson et al., Mol. Microbiol. 6, 1335 (1992))
- humane Catalase bzw. Peroxidase  
(Ezurum et al., Nucl. Acids Res. 21, 1607 (1993))
- Phosphatase, im besonderen
  - \* humane alkalische Phosphatase  
(Gum et al., Cancer Res. 50, 1085 (1990))
  - \* humane saure Prostataphosphatase  
(Sharieff et al., Am. J. Hum. Gen. 49, 412 (1991), Song et al., Gene 129,

- 291 (1993), Tailor et al., Nucl. Acids Res. 18, 4928 (1990))
- \* Typ 5 saure Phosphatase  
(Gene 130, 201 (1993))
  - Oxidase, im besonderen
    - \* humane Lysyloxidase  
(Kimi et al., J. Biol. Chem. 270, 7176 (1995))
    - \* humane saure D-aminooxidase  
(Fukui et al., J. Biol. Chem. 267, 18631 (1992))
  - Peroxidase, im besonderen
    - \* humane Gluthation Peroxidase  
(Chada et al., Genomics 6, 268 (1990), Ishida et al., Nucl. Acids Res. 15, 10051 (1987))
    - \* humane Eosinophilen-Peroxidase  
(Ten et al., J. Exp. Med. 169, 1757 (1989), Sahamaki et al., J. Biol. Chem. 264, 16828 (1989))
    - \* humane Schilddrüsen-Peroxidase  
(Kimura, PNAS USA 84, 5555 (1987)).

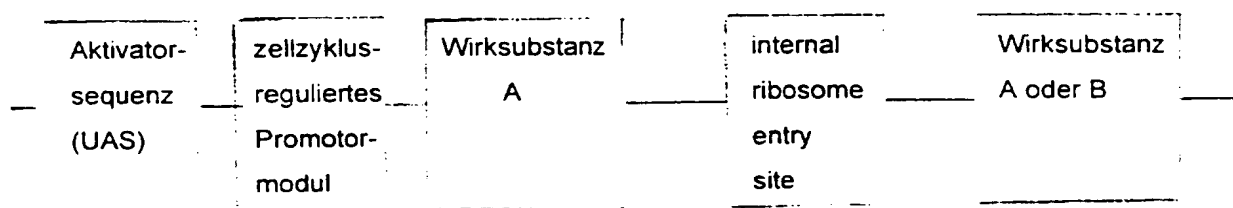
Zur Erleichterung der Sekretion der aufgeführten Enzyme kann die jeweils in der DNA-Sequenz enthaltende homologe Signalsequenz ersetzt werden durch eine heterologe, die extrazelluläre Ausschleusung verbessernde Signalsequenz.

So kann beispielsweise die Signalsequenz der  $\beta$ -Glucuronidase (DNA Position  $\leq 27$  bis 93; Oshima et al., PNAS 84, 685 (1987)) ersetzt werden durch die Signalfrequenz für das humane Immunglobulin (DNA Position  $\leq 63$  bis  $\geq 107$ ; Riechmann et al., Nature 332, 323 (1988)).

Des weiteren sind bevorzugt DNAs solcher Enzyme zu wählen, welche durch Punktmutationen in einem geringeren Maße in Lysosomen gespeichert werden. Derartige Punktmutationen wurden beispielsweise für die  $\beta$ -Glucuronidase beschrieben (Shipley et al., J. Biol. Chem. 268, 12193 (1993)).

### **6.3. Kombination von gleichen oder unterschiedlichen Wirksubstanzen für Autoimmunerkrankungen u.a.**

Gegenstand der Erfindung ist des weiteren ein Wirkstoff, in welchem eine Kombination der DNA-Sequenzen von mehreren gleichen Wirksubstanzen (A,A) oder unterschiedlichen Wirksubstanzen (A,B) vorliegt. Zur Expression z.B. von mehreren DNA-Sequenzen ist vorzugsweise die cDNA einer "internal ribosome entry site" (IRES) als regulatorisches Element zwischengeschaltet. Derartige IRES wurden von Mountford und Smith (TIG 11, 179 (1995), Kaufman et al., Nucl. Acids Res. 19, 4485 (1991), Morgan et al., Nucl. Acids Res. 20, 1293 (1992) und Dirks et al., Gene 129, 247 (1993), Pelletier und Sonenberg, Nature 334, 320 (1988), Sugitomo et al., BioTechn. 12, 694 (1994) beschrieben.



Ein derartiger Wirkstoff weist je nach Kombination additive oder synergistische Wirkung im Sinne der Erfindung auf.

#### 6.4. Auswahl des Liganden für Autoimmunerkrankungen u.a.

Als Ligand für virale und nicht-virale Vektoren, beispielsweise in kolloidalen Dispersionen hergestellt mit Polylysin-Ligand-Konjugaten, werden Substanzen bevorzugt, welche an die Oberfläche von Immunzellen (Makrophagen, Lymphozyten) spezifisch binden. Hierzu gehören Antikörper oder Antikörperfragmente gerichtet gegen Membranstrukturen von Immunzellen, wie sie beispielsweise von Powelson et al., Biotech. Adv. 11, 725 (1993) beschrieben wurden.

Des weiteren gehören zu den Liganden auch monoklonale oder polyklonale Antikörper oder Antikörperfragmente, die mit ihren konstanten Domänen an Fc- $\gamma$ - oder -Rezeptoren von Immunzellen binden (Rojanasakul et al., Pharm. Res. 11, 1731 (1994)).

Die murinen monoklonalen Antikörper sind bevorzugt in humanisierter Form

einzusetzen. Die Humanisierung erfolgt in der von Winter et al. (Nature 349, 293 (1991)) und Hoogenbooms et al. (Rev. Tr. Transfus. Hemobiol. 36, 19 (1993)) dargestellten Weise. Antikörperfragmente werden entsprechend dem Stand der Technik hergestellt, beispielsweise in der von Winter et al. (Nature 349, 293 (1991)), Hoogenboom et al. (Rev. Tr. Transfus. Hemobiol. 36, 19 (1993)), Girol (Mol. Immunol. 28, 1379 (1991)) und Huston et al. (Int. Rev. Immunol. 10, 195 (1993)) beschriebenen Weise.

Zu den Liganden gehören des weiteren alle Substanzen, welche an Membranstrukturen oder Membranrezeptoren auf der Oberfläche von Immunzellen binden. Beispielsweise gehören hierzu Wachstumsfaktoren, wie Zytokine, EGF, TGF, FGF oder PDGF, oder deren Fragmente bzw. Teilsequenzen von ihnen, die an Rezeptoren exprimiert durch derartige Zellen binden.

Hierzu gehören des weiteren Liganden, welche an Zellmembranstrukturen, wie beispielsweise den Mannose 6-Phosphat-Rezeptor auf Makrophagen in Milz, Leber, Lunge und andere Gewebe binden.

Diese Liganden und Membranstrukturen sind übersichtlich bei Perales et al., Eur. J. Biochem. 226, 255 (1994) beschrieben.

#### **6.5. Herstellung des Wirkstoffes für Autoimmunerkrankungen u.a.**

Die Herstellung des erfindungsgemäßen Wirkstoffes wird anhand folgender Beispiele näher beschrieben:

##### **a) Konstruktion des chimären Promotors IL-2-CDE-CHR-Inr**

Der humane IL-2 Promotor (Position  $\leq -373$  bis  $\geq -1$ , Williams et al., J. Immunol. 141, 662 (1988)) wird an seinem 3' Ende mit dem 5'-Terminus des CDE-CHR-Inr Moduls (Position  $\leq -20$  bis  $\geq +121$ ) des humanen cdc25C-Gens (Lucibello et al., EMBO J., 14, 132 (1995)) verknüpft (Fig. 7). Die Verknüpfung erfolgt mit Hilfe von dem Fachmann bekannten und käuflichen Enzymen.

b) Konstruktion eines Plasmids enthaltend den chimären Promotor IL-2-CDE-CHR-Inr im zentralen Bestandteil des Wirkstoffes

Die beschriebene chimäre IL-2 Repressormodul-Transkriptionseinheit wird an ihren 3' Enden mit dem 5'-Terminus einer DNA, die den kompletten kodierenden Bereich des IL-10 (Position  $\leq 76$  bis  $\geq 612$ , Moore et al., Science 248, 1230 (1990)) enthält, verknüpft (Fig. 7). Diese DNA enthält auch die für eine Sekretion notwendige Signalsequenz. Transkriptionskontrollenheiten und die DNA für IL-10 werden in pUC19/19 oder Bluescript-abgeleiteten Plasmidvektoren einkloniert, die direkt oder in kolloidalen Dispersionssystemen für eine in vivo Applikation genutzt werden können. Alternativ können die chimären Gene in virale Vektoren oder andere geeignete Vektoren transferiert und injiziert werden.

c) Konstruktion eines Plasmids enthaltend zwei Gene für Wirksubstanzen

Der humane IL-1-Rezeptor Promotor (Pos.  $\geq -489$  bis  $\geq -1$ , Ye et al., PNAS USA 90, 229 (1993)) wird an seinem 3' Ende mit dem 5'-Terminus des CDE-CHR-Inr Moduls des humanen cdc25C-Gens (Pos. -20 bis +121 (Lucibello et al., EMBO J. 14, 132 (1995)) verknüpft (siehe Fig. 7). Die Verknüpfung erfolgt mit Hilfe von dem Fachmann bekannten und käuflichen Enzymen.

Die so hergestellte chimäre IL-1-Rezeptor-Repressormodul-Transkriptionskontrollenheit wird an ihrem 3' Ende mit dem 5'-Terminus einer DNA, die den kompletten kodierenden Bereich des IL-10 enthält, verknüpft (siehe Fig. 7). Diese DNA enthält auch die für eine Sekretion notwendige Signalsequenz.

Das 3' Ende der DNA für IL-10 wird nunmehr verknüpft mit dem 5' Ende der cDNA der internal ribosome entry site (Position  $\leq 140$  bis  $\geq 630$ ; Pelletier und Sonnenberg, Nature 334, 320 (1988)) und anschließend wird deren 3' Ende mit dem 5' Ende der DNA für die Signalsequenz des Immunglobulin verknüpft (Position  $\leq 63$  bis  $\geq 107$ , Riechmann et al., Nature 332, 323 (1988)). An deren 3' Ende wird das 5' der DNA für  $\beta$ -Glucuronidase verknüpft (Position  $\leq 93$  bis  $\geq -1982$ , cDNA Sequenz ohne Signalsequenz, Oshima et al., PNAS USA 84, 685 (1985)). Dieser so hergestellte Wirkstoff



wird anschließend in puc18/19 oder in Bluescript-abgeleiteten Plasmidvektoren einkloniert, die direkt oder in kolloidalen Dispersionssystemen für eine in vivo Applikation genutzt werden können. Alternativ können die chimären Gene in virale Vektoren oder andere geeignete Vektoren transferiert und injiziert werden.

## 7) Wirkstoff zur Behandlung der Arthritis

### 7.1. Auswahl der Aktivatorsequenz für Arthritis

Als Aktivatorsequenz ist eine Nukleotidsequenz (Promotor- oder Enhancersequenz) zu verstehen, mit der Transkriptionsfaktoren gebildet oder aktiv in Synovialzellen und Entzündungszellen interagieren. Im Sinne dieser Erfindung zählen zu den bevorzugten Aktivatorsequenzen genregulatorische Sequenzen bzw. Elemente aus Genen, die für besonders in Synovialzellen und Entzündungszellen exprimierte Proteine kodieren. Dieses sind beispielsweise:

- Metalloproteinasen (MMP) (Kollagenasen, Gelatinasen, Stromelysin)

im speziellen

- \* MMP-1 (interstitielle Kollagenase)  
(Lewis et al., Int. J. Immunopharm. 14, 497 (1992))
- \* MMP-2 (72 kD Gelatinase)  
(Okada et al., Eur. J. Biochem. 194, 721 (1990))
- \* MMP-3 (Stromelysin)  
(Saus et al., J. Biol. Chem. 263, 6742 (1988), Tetlow et al., Rheum. Internat. 13, 53 (1993))
- \* MMP-9 (92 kD Gelatinase)  
(Tetlow et al., Rheum. Internat. 13, 53 (1993))

Promotorsequenzen für die Metalloproteinasen wurden beispielsweise wie folgt publiziert:

- \* MMP-1 (interstitielle Kollagenase)  
(Angel et al., Mol. Cell. Biol. 7, 2256 (1987))

- 40 -

- \* MMP-3 (Stromelysin/Transin)  
(Matrisian et al., Mol. Cell. Biol. 6, 1679 (1986), Kerr et al., Cell 61, 267 (1999))
- Tissue inhibitors of Metalloproteinasen (TIMP)

im speziellen

- \* TIMP-1  
(Kolkenbrock et al., Eur. J. Biochem. 198, 775 (1991), Faucher et al., Path. Biol. 37, 199 (1989))
- \* TIMP-2  
(Kolkenbrock et al., Eur. J. Biochem. 198, 775 (1991))
- \* TIMP-3  
(Wick et al., J. Biol. Chemistry 269, 18953 (1994)).

Die Promotorsequenzen für TIMPs wurden wie folgt publiziert:

- \* TIMP-1 (Stearns et al., Proc. Annu. Meet. Am. Assoc. Cancer Res. 33, A131 (1992))
- \* TIMP-2 (De Clerck et al., Gene 139, 185 (1994))
- \* TIMP-3:

Gegenstand der Erfindung ist des weiteren die 500 Basenpaare umfassende Promotorsequenz für das von Wick et al. (J. Biol. Chemistry 269, 18953 (1994)) beschriebene TIMP-3 Gen. Diese Promotorsequenz besteht u.a. aus den Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren NF-1 (Mcisterernst et al., Nucl. Acids Res. 16, 4419 (1988), Santoro et al., Nature 334, 218 (1988)), Sp1 (Kadonaga et al., TIBS 11, 10 (1986)) und C/EBP (Cao et al., Genes Dev. 5, 1538 (1991), Landschulz et al., Science 243, 1681 (1989)) und flankiert die transkribierte TIMP-3 Gensequenz am 5' Ende.

#### 7.1.1. Charakterisierung der humanen TIMP-3-Promotorsequenz

##### a) Isolierung und Sequenzanalyse der 5'-flankierenden

### Promotorsequenz des humanen TIMP-3-Gens

Die Induktion der TIMP-3-mRNA-Expression während der  $G_0 \rightarrow S$ -Progression beruht hauptsächlich auf einer Aktivierung der Transkription des TIMP-3-Gens (Wick et al., J. Biol. Chem. 269, 18963 (1994)). Die 5'-flankierende Sequenz des menschlichen TIMP-3-Gens wurde kloniert, der Startpunkt der Transkription der TIMP-3-mRNA bestimmt und der angrenzende Promotorbereich einer Struktur-Funktions-Analyse unterzogen. Diese Untersuchungen sollten die Regulationsmechanismen klären, die der spezifischen TIMP-3-Expression während der  $G_0 \rightarrow S$ - und  $G_1 \rightarrow S$ -Progression zugrundeliegen.

Durch eine genomische Southern Blot-Analyse wurde vorab bestimmt, ob TIMP-3 im menschlichen Genom ein Einzelgen darstellt oder mehrere Loci für das TIMP-3-Gen bzw. eventuell auch TIMP-3-Pseudogene existieren. Hierzu wurde genomische DNA aus WI-38-Zellen isoliert, mit den Restriktionsendonukleasen EcoRI, PstI und HindIII behandelt und einer Southern Blot-Analyse unterzogen. Als radioaktiv-markierte Sonde wurde ein 690 bp langes 3'-TIMP-3-cDNA-Fragment eingesetzt. Da die Sonde in allen Fällen nur ein spezifisches DNA-Fragment erkannte, ist davon auszugehen, daß nur ein singuläres TIMP-3-Gen im menschlichen Genom vorliegt.

Zur Isolierung der 5'-flankierenden TIMP-3-Gensequenz wurden ca.  $7 \times 10^5$  Phagen einer genomischen WI-38-Genbibliothek mit einem 300 bp langen 5'-TIMP-3-cDNA-Fragment hybridisiert. Von den dreizehn nach dieser Primäruntersuchung isolierten rekombinanten Phagenklonen wurden vier auch von einem 30 bp langen Oligonukleotid aus dem 5'-Endbereich der TIMP-3-cDNA erkannt. Da diese Phagen wahrscheinlich auch den das ATG-Startcodon flankierenden, 5'-Sequenzbereich enthielten, wurde einer der Phagenklone für eine nähere Charakterisierung und Analyse ausgewählt. Durch kombinierte Behandlung mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen und nachfolgender Southern Blot-Analyse konnte bestimmt werden, daß das 13 kb lange genomische DNA-"Insert" dieses Phagen ca. 4,7 kb der 5'-flankierenden TIMP-3-Gensequenz enthielt.

Durch Sequenzanalyse beider Stränge wurde die Nukleotidsequenz von annähernd 1500 bp des 5'-flankierenden Genbereichs bestimmt. Die hierfür durch eine Exonuklease III-Behandlung hergestellten 5'-Verkürzungen des klonierten 5'-Genbereichs sind in Fig. 8 illustriert.

Der Sequenzbereich, der sich durch die nachfolgend beschriebenen Struktur-Funktions-Analysen als besonders bedeutend für die TIMP-3-Promotor-Funktion herausstellte, ist in Fig. 9 gezeigt. Durch Computergestützte Analyse wurden in der TIMP-3-Promotorsequenz eine Reihe von Elementen identifiziert, die den Bindungsstellen bekannter Transkriptionsfaktoren ähneln, u.a. 4 Sp1-Bindungsstellen, eine mögliche NF1- sowie eine C/EBP-Bindungsstelle (markiert in Fig. 9).

b) Kartierung des Transkriptionsstartpunktes der TIMP-3-mRNA

Um den oder die Startpunkt(e) der Transkriptionsinitiation zu ermitteln, wurde das 5'-Ende der TIMP-3-mRNA durch eine Primer-Extension-Analyse bestimmt. Hierbei wurde eine Transkriptionsstartstelle (Nucleotidsequenz: GGGCGGGCCCAACAGCCCG) identifiziert, die 364 bp 5' vom ATG-Startcodon lokalisiert ist (markiert in Fig. 9). Trotz genauer Untersuchung der aufwärts der Startstelle gelegenen Nukleotidsequenz wurde weder eine TATA-Box noch TATA-ähnliche Sequenzen gefunden.

c) Untersuchungen zur Aktivität der TIMP-3-Promotorsequenz

Um die Aktivität der TIMP-3-Promotorsequenz in normal proliferierende, ruhende und serumstimulierende Zellen zu bestimmen und erste Hinweise auf funktionell wichtige Promotorbereiche zu erhalten, wurden die zur Sequenzierung verwendeten 5'-verkürzten Promotorfragmente (s. Fig. 8) vor das Luziferasegen in den promotorlosen pXP-2-Vektor (Nordeen, Biotechniques 6, 454 (1988)) kloniert. Durch seine äußerst geringe Basalaktivität eignet sich dieses "Reporterkonstrukt" besonders zur Durchführung transienter Expressionsanalysen.

d) Aktivität der TIMP-3-Promotorsequenz in normal proliferierenden und serumstimulierten NIH3T3-Zellen

Um zu zeigen, daß die isolierte TIMP-3-Promotorsequenz in transienten Expressionsanalysen aktiv ist, d.h. die Transkription des Luziferase-Reportergens steuern kann, wurde das TIMP-3-Promotor-Deletionskonstrukt  $\Delta$ -1010 (umfaßt die Nukleotide -1010 bis +281, s. Fig. 8) in NIH3T3-Zellen transfiziert und die Luziferase-Aktivität in diesen normal proliferierenden oder serumstimulierten transfizierten Zellen bestimmt. Zum Vergleich wurde zusätzlich die Expression von weiteren Luziferase-Promotorkonstrukten ermittelt, die den Herpes Virus tk-Promotor (pT81; Lucibello und Müller, Meth. Mol. Cell Biol. 1, 9 (1989)), einen 5xTRE-Minimalpromotor (Angel et al., Mol. Cell Biol. 7, 2256 (1987)), einen RSV-LTR (Setoyama et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 3213 (1986) oder ein 937 bp langes Fragment des menschlichen Cyclin D1-Promotors (Herber et al., Oncogene 9, 1295 (1994)) enthielten. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tabelle 2 aufgeführt.

In normal proliferierenden NIH3T3-Zellen (Tab. 2A) wurde das TIMP-3-Promotorkonstrukt  $\Delta$ -1010 ca. 3-fach höher exprimiert als der 5xTRE-Minimalpromotor und zeigt eine 7-fach höhere Expression als das Cyclin D1-Promotorkonstrukt. Einzig das RSV-LTR-Reporterplasmid wies eine ca. 2-fach höhere Aktivität als das TIMP-3-Promotorkonstrukt auf. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß der menschliche TIMP-3-Promotor durch eine vergleichsweise hohe transkriptionelle Aktivität gekennzeichnet ist. Wie in Tab. 2B und Fig. 11 gezeigt, wurde das TIMP-3-Promotorkonstrukt  $\Delta$ -1010 außerdem deutlich in Zellen induziert, die nach zweitägigem Serumentzug für 4 h mit 20% FKS stimuliert worden waren. Verglichen mit ruhenden ( $G_0$ ) Zellen stieg die Expression dabei ca. 7- bis 8-fach an, was etwa 3,5-fach bzw. 2,4-fach höher lag als die beobachteten Induktionswerte des 5xTRE-Reporterkonstruktes bzw. des Cyclin D1-Promotorkonstrukts. Dagegen zeigte das Herpes simplex tk-Promotor-Luziferasekonstrukt (pT81) keine Induktion seiner Expression nach Serumstimulation.

In Fig. 10 ist die Kinetik der Induktion des  $\Delta$ -1010 TIMP-3-Promotorkonstrukts nach Serumstimulation ruhender Zellen gezeigt. Die Luziferase-Aktivität stieg bereits nach 1 h an und erreichte mit einer 7-

fachen Induktion nach 4 h Maximalwerte.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, daß das verwendete  $\Delta$ -1010 TIMP-3-Promotorkonstrukt die wesentlichen, wenn nicht alle regulatorischen Elemente aufweist, die für eine effiziente Transkription sowie für die Induzierbarkeit durch Serum benötigt werden.

e) Struktur- und Funktionsanalyse der TIMP-3-Promotorsequenz

Eine Struktur- und Funktionsanalyse der isolierten TIMP-3-Promotorsequenz sollte erste Hinweise auf diejenigen Promotorregionen liefern, die für die Basalexpression sowie die Seruminduzierbarkeit funktionell bedeutend sind. Hierzu wurde die Aktivität der verschiedenen, für die Promotorsequenzierung hergestellten und in den pXP-2-Vektor umklonierten, TIMP-3-Promotor-Deletionskonstrukte (s. Fig. 8) in transienten Expressionsanalysen bestimmt. Die Analyse der basalen Expression der verschiedenen Deletionskonstrukte in normal proliferierenden NIH3T3-Zellen (Fig. 11) ergab drei wesentliche Ergebnisse:

1. Die stärkste Expression wies das Promotorkonstrukt  $\Delta$ -1010 auf. Eine Verkürzung um weitere 85 bp (Konstrukt  $\Delta$ -925) führte zu einem annähernd 2-fachen Absinken der Promotoraktivität. Dies deutet auf die Präsenz von einem oder mehreren Elementen in der Region zwischen Position -1010 und -925 hin, die an der Transkriptionsaktivierung beteiligt sind.
2. Durch weitere Verkürzungen des 5'-Endes bis hin zu Position -112 wurde die Promotoraktivität nicht signifikant beeinflusst. Die Region zwischen -925 und -112 enthält daher wahrscheinlich keine für die Promotoraktivität wichtigen Sequenzbereiche.
3. Die Region zwischen Position -1300 und -1010 scheint dagegen einen negativen Effekt auf die Promotoraktivität auszuüben, was sich in der im Vergleich zum Promotorkonstrukt  $\Delta$ -1010 ca. 4-fach reduzierten Expression des  $\Delta$ -1300 Deletionskonstrukts ausdrückt.

Im abschließenden Experiment wurde die Seruminduzierbarkeit der verschiedenen TIMP-3-Promotor-Deletionskonstrukte analysiert. Die Ergebnisse dieser, wie in Tabelle 2 beschriebenen durchgeführten, Expressionsanalysen sind in Fig. 11b dargestellt. Auffällig ist das ähnliche Expressionsprofil zwischen normal proliferierenden (Fig. 11a), ruhenden und serumstimulierten Zellen (Fig. 11b). Die Expressionswerte in ruhenden Zellen lagen aber ca. 2-fach niedriger als in proliferierenden Zellen und wurden 4 h nach Serumstimulation 2,9- bis 8,5-fach induziert. Wie in den proliferierenden Zellen gezeigt (Fig. 11a), übt die Region zwischen Position  $\Delta$ -1300 und  $\Delta$ -1010 einen negativen Effekt auf die Promotoraktivität in ruhenden und serumstimulierten Zellen aus, hat aber keinen Einfluß auf die Seruminduzierbarkeit des Konstruktes  $\Delta$ -1300 (8,5-fache Induktion). Auch hier wurden die höchsten Luziferaseaktivitäten wieder mit dem Deletionskonstrukt -1010 gemessen.

Weitere Verkürzungen des 5'-Endes bis zu Position -660 führten nur zu einem 1,5- bis 2-fachen Absinken der Promotoraktivität. Alle diese Konstrukte ( $\Delta$ -1300,  $\Delta$ -1010,  $\Delta$ -925,  $\Delta$ -660) zeigten aber eine deutliche, 6- bis 8-fache Induktion nach Serumzugabe. Die Verkürzung um weitere 200 bp bis zu Position -463 ( $\Delta$ -463) bewirkte ein erneutes 2-faches Absinken der Aktivität, hatte aber ebenfalls keinen Einfluß auf die Seruminduzierbarkeit des Konstrukts. Erst das Konstrukt  $\Delta$ -112 zeigte mit einem nur 3-fachen Expressionsanstieg nach Serumstimulation eine 50-65%ige Reduktion seiner Seruminduzierbarkeit. Dies deutet darauf hin, daß die Region zwischen Position -463 und -112 Element(e) enthält, die für die Seruminduzierbarkeit des TIMP-3-Promotors von Bedeutung sind. Zusätzliche Regionen zwischen Position -463 und -660 sowie -925 und -1010 verstärken generell und zellzyklusunabhängig die seruminduzierte Promotoraktivität.

Die Ergebnisse der Charakterisierung sowie Struktur- und Funktionsanalyse des 5'-flankierenden TIMP-3-Genbereiches lassen sich wie folgt zusammenfassen:

TIMP-3 stellt ein TAT-Box-loses Gen dar. Die Transkription wird aber

dennoch an nur einer Startstelle 364 bp aufwärt vom ATG-Startcodon initiiert. Verglichen mit anderen Promotoren weist die TIMP-3-Promotorsequenz eine relativ hohe Aktivität auf, für die die ersten 112 bp ausreichend sind. In dieser Region befinden sich zahlreiche Sp1-Bindungsstellen. Außerdem zeigt er eine deutliche Induktion seiner Aktivität nach Serumstimulation ruhender Zellen, deren Kinetik der TIMP-3-mRNA-Expression während der G<sub>0</sub>-S-Progression entspricht. Die für die Seruminduzierbarkeit verantwortlichen Regulationselemente sind in der Region zwischen Position -112 und -463 lokalisiert.

Aktivatorsequenzen im Sinne dieser Erfindung sind des weiteren Promotoren für den

- GM-CSF-Rezeptor  
(Nakagawa et al., J. Biol. Chem. 269, 10905 (1994))
- Makrophagen-Colony Stimulating Factor (M-CSF)-Rezeptor  
(Yue et al., Mol. Cell. Biol. 13, 3191 (1993), Zhang et al., Mol. Cell. Biol. 14, 373 (1994))
- Typ I und II Makrophagen Scavenger Rezeptoren  
(Mouton et al., Mol. Cell. Biol. 14, 4408 (1994))

## 7.2. Auswahl der Wirksubstanz für Arthritis

Als Wirksubstanz im Sinne der Erfindung ist eine DNA-Sequenz zu verstehen, deren exprimiertes Protein die Entzündung beispielsweise im Gelenk direkt oder indirekt hemmt und/oder die Rekonstitution von extrazellulärer Matrix (Knorpel, Bindegewebe) im Gelenk fördert. Zu diesen Proteinen zählen beispielsweise folgende Proteine (die DNA-Sequenz für das jeweilige Protein ist den angegebenen Literaturstellen zu entnehmen):

- IL-1-Rezeptorantagonist (IL-1-RA)  
(Thompson et al. (1992), Eisenberg et al., Nature 343, 341 (1990), Carter et al., Nature 344, 63 (1990))  
IL-1-RA inhibiert die Bindung von IL-1 $\alpha$ , $\beta$  an den spezifischen Rezeptor (Conti et al., (1992), Granowietz et al., (1992)), IL-1 aktiviert Synovialzellen und ist hierdurch entzündungsfördernd (Dayer et al., Eur.



Cytokine Network 5/6, 563 (1994))

- löslicher IL-1-Rezeptor

(Sims et al., Clin. Immun. Immunopath. 72, 9 (1994), Sims et al., Nature 35, 88 (1988), Sims et al., PNAS USA 86, 8946 (1989) (I), Dower et al., J. Exp. Med. 162, 501 (1985), Chizzonite et al., PNAS 86, 8029 (1989), McMahan et al., EMBO J. 10, 2821 (1991) (II), Sims et al., Science 241, 585 (1988))

Löslicher IL-1-Rezeptor bindet und inaktiviert IL-1 (Fanslow et al., Science 248, 739 (1990), Jacobs et al., J. Immunol. 146, 2983 (1991))

- IL-6

(Hirano, Int. J. Cell Cloning 9, 166 (1991), Brach et al., Int. J. Clin. Lab. Rec. 22, 143 (1992), Wong et al., Immunol. Today 9, 137 (1988), Brakenhoff et al., J. Immunol. 143, 1175 (1989), Yasukawa et al., EMBO J. 6, 2939 (1987))

IL-6 erhöht die Sekretion von TIMP und Superoxiden und vermindert die Sekretion von IL-1 und  $\text{TNF}\alpha$  durch Synovialzellen und Chondrozyten (Shingu et al., Clin. Exp. Immunol. 94, 145 (1993), Shingu et al., Inflammation 18, 613 (1994)).

- löslicher TNF-Rezeptor

(Olson et al., Eur. Cytokine Network 4, 169 (1993), Tartaglia et al., Immunol. Today 13, 151 (1992), Nophar et al., EMBO J. 9, 3269 (1990), Himmler et al., DNA Cell Biol. 9, 705 (1990), Aggarwal et al., Nature 318, 665 (1985), Gray et al., PNAS 87, 7380 (1990), Tartaglia et al., Immunol. Today 13, 151 (1992), Loetcher et al., Cell 61, 351 (1990), Schall et al., Cell 61, 361 (1990), Smith et al., Science 248, 1019 (1990), Goodwin et al., Mol. Cell. Biol. 11, 3020 (1991))

Löslicher TNF-Rezeptor bindet und inaktiviert TNF. TNF aktiviert Synovialzellen zur erhöhten Sekretion von Metalloproteinasen (Dayer et al., Eur. Cytokine Network 5/6, 563, 1994))

- IL-4

(Paul, J. Am. Soc. Hemat. 77, 1859 (1991), Yokota et al., PNAS USA 83, 5894 (1986), Paul, Blood 77, 1859 (1991), von Leuven et al., Blood 73, 1142 (1989), Arai et al., J. Immunol. 142, 274 (1989))

- 48 -

IL-4 inhibiert die Bildung und Sekretion von IL-1,  $\text{TNF}\alpha$  und MMP (Corcoran et al., J. Biol. Chemistry 267, 515 (1992), Dayer et al., Eur. Cytokine Network 5/6, 563 (1994), te Velde et al., Blood 76, 1392 (1990))

- IL-10

(Moore et al., Science 248, 1230 (1990), Vieira et al., PNAS USA 88, 1172 (1991), Kim et al., J. Immunol. 148, 3618 (1992))

IL-10 inhibiert die Bildung und Sekretion von IL-1,  $\text{TNF}\alpha$  und MMP und erhöht die Sekretion von TIMP (Dayer et al., Eur. Cytokine Network 5/6, 563 (1994))

- Insulin-like growth factor (IGF-1)

(Jansen et al., Nature 306, 609 (1983), Ullrich et al., EMBO J. 3, 361 (1984), Bell et al., PNAS 82, 6450 (1985), Rotwein et al., PNAS 83, 77 (1986), J. Biol. Chem. 261, 4828 (1986), Jansen et al., FEBS Lett. 179, 243 (1985)) Tobin et al., Mol. Endocrin. 4, 1914 (1990), Macaulay, Brit. J. Cancer 65, 311 (1992))

IGF-1 stimuliert die Synthese von extrazellulärer Matrix.

-  $\text{TGF}\beta$

im speziellen

\*  $\text{TGF}\beta 1$  und  $\text{TGF}\beta 2$

(Massague, Ann. Rev. Cell. Biol. 6, 597 (1990), Kondiah et al., J. Biol. Chem. 265, 1089 (1990), Garnier et al., J. Molec. Biol. 120, 97 (1978), Wahl et al., Immunol. Today 10, 258 (1989), Dupuy D'Angeac et al., J. Cell Physiol. 147, 460 (1991))

$\text{TGF}\beta$  stimuliert die Synthese von extrazellulärer Matrix.

- Superoxiddismutase (Folz et al., Genomics 22, 162 (1994), Wan et al. 13/11, 1127 (1994))

- TIMP (Tissue Inhibitors of Metalloproteinases)

im speziellen

- \* TIMP-1 (Docherty et al., Nature 318, 66 (1985))
- \* TIMP-2 (Stetler-Stevenson et al., J. Biol. Chem. 265, 13933 (1990))
- \* TIMP-3 (Wick et al., J. Biol. Chemistry, 269, 18953 (1994))

Als Wirksubstanz im Sinne der Erfindung können jedoch auch DNA-Sequenzen von Fusionsproteinen zwischen den aufgeführten Cytokinen, Wachstumsfaktoren oder dem extrazellulären Teil der Rezeptoren zum einen und dem Fc-Teil des menschlichen Immunglobulins zum anderen Verwendung finden. Derartige cDNA-Sequenzen und ihre Herstellung wurden in der EPA 0464 633 A1 beschrieben.

### 7.3. Kombination gleicher oder unterschiedlicher Wirksubstanzen für Arthritis

Gegenstand der Erfindung ist des weiteren ein Wirkstoff, in welchem eine Kombination der DNA-Sequenzen von mehreren gleichen antientzündlichen Substanzen (A,A) oder von unterschiedlichen antientzündlichen Substanzen (A,B) vorliegt. Zur Expression von zwei DNA-Sequenzen wird vorzugsweise die cDNA einer "internal ribosome entry site" (IRES) als regulatorisches Element zwischengeschaltet.

Aktivator- sequenz (UAS)	zellzyklus- reguliertes Repressor- modul	antientzünd- liche Substanz A	internal ribosome entry site	antientzünd- liche Substanz A oder B
--------------------------------	---	--	---------------------------------------	---

Derartige IRES wurden beispielsweise von Mountford und Smith (TIG 11, 179 (1995), Kaufman et al., Nucl. Acids, Res. 19, 4485 (1991), Morgan et al., Nucl. Acids Res. 20, 1293 (1992), Dirks et al., Gene 128, 247 (1993), Pelletier und Sonenberg, Nature 334, 320 (1988) und Sugitomo et al., BioTechn. 12, 694 (1994)) beschrieben.

So kann die cDNA der IRES-Sequenz des Poliovirus (Position  $\leq 140$  bis  $\geq 630$  des 5' UTR (Pelletier und Sonenberg, Nature 334, 320 (1988)) zur Verknüpfung der DNA der antientzündlichen Substanz A (am 3' Ende) mit der DNA der antientzündlichen Substanz B (am 5' Terminus) verwendet werden.

Ein derartiger Wirkstoff weist, je nach Kombination, additive ( $A+A$ ,  $A+B_1$ ) oder synergistische Wirkung im Sinne der Erfindung auf.

#### 7.4. Auswahl des Liganden für Arthritis

Als Ligand für virale und nicht-virale Vektoren, beispielsweise in Polylysin-Ligand-Konjugaten, werden Substanzen bevorzugt, welche an die Oberfläche von Synovialzellen binden. Hierzu gehören monoklonale oder polyklonale Antikörper oder Antikörperfragmente, die mit ihren variablen Domänen an Membranstrukturen von Synovialzellen oder Entzündungszellen binden, welche beispielsweise sind

- Vimentin (Miettinen et al., Am. J. Pathol. 117, 18 (1984))
- Fibronectin (Wojciak et al., Clin. Exp. Immunol. 93, 108 (1993))

Hierzu gehören auch monoklonale oder polyklonale Antikörper oder Antikörperfragmente, die mit ihren konstanten Domänen an Fc-Rezeptor binden (Rojanasakul et al., Pharm. Res. 11, 1731 (1994)).

Die murinen monoklonalen Antikörper sind bevorzugt in humanisierter Form einzusetzen. Die Humanisierung erfolgt in der von Winter et al. (Nature 349, 293 (1991) und Hoogenbooms et al. (Rev. Tr. Transfus. Hemobiol. 36, 19 (1993) dargestellten Weise. Antikörperfragmente werden gemäß dem Stand der Technik hergestellt, beispielsweise in der von Winter et al., Nature 349, 293 (1991), Hoogenboom et al., Rev. Tr. Transfus. Hemobiol. 36, 19 (1993), Girol, Mol. Immunol. 28, 1379 (1991) oder Huston et al., Int. Rev. Immunol. 10, 195 (1993) beschriebenen Weise.

Hierzu gehören des weiteren alle Wirkstoffe, welche an Membranstrukturen oder Membranrezeptoren auf Synovialzellen binden. Beispielsweise gehören hierzu Cytokine oder Wachstumsfaktoren oder deren Fragmente bzw. Teilsequenzen von ihnen, die an Rezeptoren exprimiert durch Synovialzellen binden wie beispielsweise IL-1-RA,  $TNF\alpha$ , IL-4 IL-6, IL-10, IGF,  $TGF\beta$ .

Desweiteren gehören hierzu Liganden, deren wesentlicher Bestandteil endständige Mannose ist, welche an Mannose-6-phosphatrezeptoren auf Makrophagen bindet (Perales et al., Eur. J. Biochem. **226**, 255 (1994)).

## 7.5. Herstellung des Wirkstoffes für Arthritis

### a) Konstruktion des chimären Promotors TIMP-3-CDE-CHR-Inr

Der humane TIMP-3 Promotor (Pos.  $\leq -463$  bis  $\geq -2$ ) oder verkürzte Varianten (Pos.  $\leq -112$  bis  $\geq -2$  oder  $\leq -463$  bis  $\geq -10$  oder  $\leq -112$  bis  $\geq -10$ ) werden an ihrem 3' Ende mit dem 5'-Terminus des CDE-CHR-Inr Moduls (Pos.  $\leq -20$  bis  $\geq +121$ ) des humanen cdc25C-Gens (Pos.  $\leq -20$  bis  $\geq +121$ ) verknüpft (Fig. 12). Die Verknüpfung erfolgt mit Hilfe von dem Fachmann bekannten und käuflichen Enzymen. Es werden verschiedene Fragmente der TIMP-3 Promotorsequenz verwendet, um (1) ein möglichst kurzes Promotorfragment (bei möglichst effizienter Transkription) einsetzen zu können und (2) ungewünschte Effekte des TIMP-3 Initiators (Bereich bei +1) auf die Regulation durch CDE/CHR auszuschalten.

### b) Konstruktion eines Plasmids enthaltend den zentralen Bestandteil des Wirkstoffes

Die unter a) beschriebenen chimären TIMP-3 Promotormodul-Transkriptionskontrolleneinheiten werden an ihren 3' Enden mit dem 5'-Terminus einer DNA, die den kompletten kodierenden Bereich des 152 Aminosäuren langen IL-1-Rezeptor-Antagonisten enthält (DNA Pos.  $\leq 25$  bis  $\geq 557$ ; Eisenberg et al., Nature **343**, 341 (1990)), verknüpft. Diese DNA enthält auch die für eine Sekretion notwendige Signalsequenz (25 N-terminale Aminosäuren) (Fig. 12). Transkriptionskontrolleneinheiten und IL-1-Rezeptor-Antagonist DNA werden in pUC18/19 oder Bluescript-abgeleiteten Plasmidvektoren einkloniert, die direkt (Yovandich et al., Hum. Gene Ther. **6**, 603 (1995)) oder in kolloidalen Dispersionssystemen für eine in vivo Applikation zur Transduktion von Synovialzellen genutzt werden können. Alternativ können die zusammengefügte Transkriptionskontrolleneinheiten und IL-1-Rezeptor-Antagonisten DNA in virale Vektoren oder andere geeignete Vektoren trans-

feriert und injiziert werden.

## 8) Herstellung eines Wirkstoffes gegen Infektionserreger

Der Wirkstoff kann in zwei grundsätzlich unterschiedlichen Formen hergestellt werden

- für die Therapie von Virusinfektionen und Parasiteninvasionen oder aber
- für die Prophylaxe von Infektionserkrankungen durch Viren, Bakterien oder Parasiten.

Zur Prophylaxe von Infektionserkrankungen dienen Impfstoffe. Die Möglichkeiten, auf konventionellem Wege wirkungsvolle Impfstoffe herzustellen, sind jedoch beschränkt (Brown, Int.J. Technol. Assessm. Health Care 10, 161 (1994), Ellis, Adv. Exp. Med. Biol. 327, 263 (1992), Arnon et al., FASEB J. 6, 3265 (1992)).

Demzufolge wurde die Technologie der DNA-Vakzine entwickelt. Diese DNA-Vakzinen werfen jedoch Fragen zur Sicherheit und zu Nebenwirkungen auf (Fynan et al., Int. J. Immunopharm. 17, 79 (1995), Donnelly et al., Immunol. 2, 20 (1994)).

Wirkstoffe zur Prophylaxe von Infektionserkrankungen im Sinne dieser Erfindung zeichnen sich wegen ihrer Zellspezifität und Zellzyklusregulation durch ein hohes Maß an Sicherheit aus.

### 8.1. Auswahl der Aktivatorsequenz

#### a) zur Therapie von Infektionserkrankungen

Als Aktivatorsequenz sind Promotorsequenzen von Proteinen auszuwählen, welche besonders von Bakterien oder Parasiten gebildet werden oder es sind Promotorsequenzen solcher Viren auszuwählen, die die von ihnen infizierten Zellen transformieren und zur Proliferation anregen.

Zu diesen Viren gehören beispielsweise HBV, HCV, HSV, HPV, HIV, EBV und HTLV.

Promotorsequenzen für derartige Viren wurden wie folgt beschrieben:

- \* HBV  
(Sato et al., *Annals Int. Med.* 122, 241 (1995), Raney et al., *J. Gen. Virol.* 75, 2671 (1994), Raney et al. *J. Virol.* 66, 6912 (1992), Zhang et al., *J. Virol.* 67, 1472 (1993), Guo et al., *J. Virol.* 65, 6686 (1991))
- \* HCV  
(Matsuura et al., *Interviol.* 37, 114 (1994), Kumar et al., *J. General Virol.* 73, 1521 (1992), Kim et al., *Jap. J. Med. Sci. Biol.* 47, 211 (1994))
- \* HSV  
(Greco et al., *J. Gen. Virol.* 75, 1693 (1994), Papavassiliou et al., *J. Biol. Chem.* 265, 9402 (1990))
- \* HPV  
(May et al., *EMBO J.* 13, 1460 (1994), Thierry et al., *EMBO J.* 6, 3391 (1987))
- \* EBV  
(Chen et al., *DNA and Cell Biol.* 14, 205 (1995), Nonkwelo et al., *Virol.* 206, 183 (1995), Smith et al., *J. Virol.* 66, 706 (1992), Lear et al., *J. Virol.* 66, 7461 (1992), Rooney et al., *J. Virol.* 66, 496 (1992))
- \* HTLV  
(Ohtani et al., *EMBO J.* 6, 389 (1987))
- \* HIV  
(Koken et al., *Virol.* 191, 968 (1992), Berghout et al., *J. Virol.* 66, 139 (1992), Cherrington et al., *EMBO J.* 11, 1513 (1992), Rosen et al., *Cell* 41, 813 (1985))

Die HIV- (long terminal repeat) LTR-Sequenz dient als Bindungsstelle für zelluläre transaktivierende Faktoren, die in zahlreichen unterschiedlichen Zellen und Geweben vorkommen (Levy, *AIDS* 4, 1051 (1990)). Zu diesen gehören die Transkriptionsfaktoren SP1, EBP-1, UBP-1, NF-KB, LBP-1 und CTN-NF (Garcia et al., *EMBO J.* 6, 3761 (1987)). Am 3' Ende des LTR befindet sich die Transaktivatorregion (TAR), an welche das Transaktivatorprotein (TAT) von HIV bindet (Cullen, *Cell* 63, 655 (1986), Selby et al., *Genes and Dev.* 3, 547 (1989)). Eine weitere Bindungsstelle für das TAT

Protein wurde in der NF-KB Domäne des HIV-LTR beschrieben (Taylor et al., EMBO J. 11, 3395 (1992)). Das Transaktivatorprotein (TAT) von HIV kann die Expression des LTR Genes von HIV um mehr als das hundertfache steigern (Dayton et al., Cell 44, 941 (1986), Rosen et al., Nature 319, 555 (1986), Laspiä et al., Cell 59, 283 (1989)). Die TAR-Region ist somit integraler Bestandteil der Transkription und Translation von HIV-LTR (Garcia et al., EMBO J., 8, 765 (1989)). HIV-LTR kann als Promotor nicht nur für HIV-Gene sondern auch für heterologe Reportergene und für letztere auch ohne die Anwesenheit von HIV-TAT dienen (Banerjee et al., Hepatol. 10, 1008 (1989), Virology 179, 410 (1990)). Anhaltspunkte bestehen, daß diese Promotoraktivität durch zelluläre Transkriptionsfaktoren, die dem HIV-TAT funktionell ähneln, aktiviert werden. Diese Aktivierung durch zelluläre TAT-ähnliche Faktoren ist im allgemeinen jedoch geringer als durch HIV-TAT (Sodroski et al., Science 229, 74 (1985), Dayton et al., Cell 44, 941 (1986), Rosen et al., Nature 319, 555 (1986)). Eine relativ starke Aktivierung des HIV-LTR durch zelluläre TAT-ähnliche Faktoren konnte jedoch in Leberzellen beobachtet werden (Pizzella und Banerjee, DNA and Cell Biol. 13, 67 (1994)).

TAR liegt sowohl als DNA als auch als RNA vor. Experimentelle Studien zeigen jedoch, daß die TAR als RNA durch deren Sekundärstruktur an TAT bindet und funktionell aktiv ist (Roy et al., J. Virol 64, 1402 (1990)), d.h. an die korrespondierende Promotor DNA bindet und diese aktiviert (Berkhout et al., Cell 62, 757 (1990)). TAR ist, wenn überhaupt, nur geringfügig aktiv in Verbindung mit einem heterologen Promotor (Maesing et al., Cell 48, 691 (1987), Berkhout et al., Cell 62, 757 (1990)) des weiteren ist eine optimale Funktion von TAR nur bei direkter Nachbarschaft zu den am 5' Terminus von TAR angrenzenden Nukleotidsequenzen des HIV-LTR Promotors, insbesondere der NF-KB/SP1-Bindungsregion, gewährleistet (Berkhout et al., Cell 62, 757 (1990)).

Für HIV ist somit die gesamte LTR-Sequenz einschließlich der TAR-Sequenz (Position  $\leq -453$  bis  $\geq +80$ , Rosen et al., Cell 41, 813 (1985)) als virusspezifischer Promotor einzusetzen.

c) zur Prophylaxe von Infektionskrankheiten



Als Aktivatorsequenz sind Promotorsequenzen der Gene solcher Proteine auszuwählen, welche in aktivierten Makrophagen und aktivierten Lymphozyten in besonderem Maße gebildet werden. Beispiele für derartige Proteine und ihre Gene wurden im Abschnitt 6.1. aufgeführt.

## 8.2. Auswahl der Wirksubstanz

### a) zur Therapie von Infektionserkrankungen

Als Wirksubstanz ist die DNA eines Proteins auszuwählen, welches zytostatische, zytotoxische oder antivirale Wirkungen aufweist. Beispiele für zytotoxische oder zytostatische Proteine wurden schon im Abschnitt 6.2. e-g) aufgeführt. Bei Wahl eines Enzyms (siehe hierzu Abschnitt 6.2.g) ist nachfolgend die durch dieses Enzym spaltbare Vorstufe einer antiviralen zytotoxischen oder antiparasitären Substanz zu verabreichen.

Wirksubstanzen für antivirale Proteine im Sinne dieser Erfindung sind des weiteren antiviral wirksame Cytokine und Wachstumsfaktoren. Hierzu zählen beispielsweise die DNA-Sequenzen für folgende Wirksubstanzen:

- IFN $\alpha$   
(Henco et al., J. Mol. Biol. 185, 227 (1985), Pestka et al., Ann. Rev. Biochem. 56, 727 (1987), Weissmann et al., Phil. Trans. R. Soc. Lond. B299, 7 (1982), Goeddel et al., Nature 290, 20 (1981))
- IFN $\beta$   
(Sen et al., J. Biol. Chem. 267 5017 (1992), Mark et al. EP 192 811, EP 234 599, US 45 88 585)
- IFN- $\gamma$   
(Gray et al., Nature 295, 503 (1982), Yip et al., PNAS USA 79, 1820 (1982), Rinderknecht et al., J. Biol. Chem. 259, 6790 (1984))
- TNF $\beta$   
(Gray et al., Nature 312, 721 (1984), Li et al., J. Immunol. 138, 4496 (1987), Aggarwal et al., J. Biol. Chem. 260, 2334 (1985))
- TNF $\alpha$   
(Beutler et al., Nature 320, 584 (1986), Kriegler et al., Cell 53, 45 (1988))

- IL-1  
(Furrtani et al., Nucl. Acids Res. 14, 3167 (1986), Lafage et al., Blood 73, 104 (1989), March et al., Nature 315, 641 (1985), Bensi et al., Gene 52, 95 (1987), Auron et al., PNAS 81, 7907 (1984), Clark et al., Nucl. Acids Res. 14, 7897 (1986))
- TGF $\beta$   
(Massague, Ann. Rev. Cell Biol. 6, 597 (1990), Kondiah et al., J. Biol. Chem. 265, 1089 (1990), Garnier et al., J. Molec. Biol. 120, 97 (1978))

Als Wirksubstanz im Sinne der Erfindung können jedoch auch DNA-Sequenzen von Fusionsproteinen zwischen den aufgeführten Cytokinen, Wachstumsfaktoren oder dem extrazellulären Teil der Rezeptoren zum einen und dem Fc-Teil des menschlichen Immunglobulins zum anderen Verwendung finden. Derartige DNA-Sequenzen und ihre Herstellung wurden in der EP 0 464 633 A1 beschrieben.

Desweiteren ist Wirksubstanz im Sinne dieser Erfindung die DNA-Sequenz für einen Antikörper einer Spezifität, die das jeweilige Virus inaktiviert oder dessen V<sub>H</sub> und V<sub>L</sub> enthaltende Fragmente oder dessen über einen Linker verbundene V<sub>H</sub> und V<sub>L</sub> Fragmente, hergestellt beispielsweise entsprechend der von Marasco et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 7889 (1993)) beschriebenen Methodik. Beispiele für Antikörper einer derartigen Spezifität gegen Viren werden im Abschnitt 8.4. aufgeführt.

Desweiteren ist Wirksubstanz im Sinne dieser Erfindung die DNA-Sequenz für ein Rev bindendes Protein. Diese Proteine binden an die Rev-RNA und inhibieren Rev-abhängige posttranskriptionelle Stufen der Retrovirus-Genexpression. Beispiele für Rev-bindende Proteine sind:

- RBP9-27  
(Constantoulakis et al., Science 259, 1314 (1993), Reid et al., PNAS USA 86, 840 (1989))
- RBP1-8U  
(Kerr und Stark, FEBS Lett. 285, 194 (1991), Friedman et al., Cell 38, 745 (1984))
- RBP1-8D

(Lewin et al., Eur. J. Biochem. 199, 417 (1991))

- Pseudogene von RBP1-8

(Lewin et al., Eur. J. Biochem. 199, 417 (1991)).

b) zur Prophylaxe von Infektionserkrankungen

Als Wirksubstanz ist die DNA eines vom Infektionserreger gebildeten Proteins auszuwählen, welches durch eine Immunreaktion, d.h. durch Antikörperbindung und/oder durch zytotoxische T-Lymphozyten zur Neutralisierung und/oder zur Abtötung des Erregers führt. Derartige Neutralisationsantigene werden als Impfantigene bereits angewandt (siehe Übersicht bei Ellis, Adv. Exp. Med. Biol. 327, 263 (1992)). Beispiele für DNA-Sequenzen, die Neutralisationsantigene kodieren, sind durch die folgenden Arbeiten zugänglich:

- Influenza A-Virus-Antigen  
(Ulmer et al., Science 259, 1745 (1993), Robinson et al., Vaccine 11, 957 (1993), Fynan et al., Int. J. Immunopharmac. 17, 79 (1995))
- HIV-Antigene  
(Wang et al., PNAS USA 90, 4156 (1993))
- Tollwut-Virus-Antigen  
(Donnelly et al., Immunol. 2/1, 20 (1994))
- HSV (Herpes Simplex Virus)-Antigen  
(Fleckenstein et al., Nature 274, 57 (1978))
- RSV (Respiratory Syncytial Virus)-Antigen  
(Du et al., Bio/Tech. 12, 813 (1994), Hall, Science 265, 1393 (1993))
- Parainfluenza-Virus-Antigen  
(Du et al., Bio/Techn. 12, 813 (1994))
- Rotavirus-Antigen  
(Albert et al., J. Clin. Microbiol. 25, 183 (1987), Anderson et al., J. Infect. Dis. 153, 823 (1986), Battaglia et al., J. Infect. Dis. 155, 140 (1987), Chanock et al., J. Infect. Dis. 148, 49 (1983), Dyall-Smith et al., J. Virol. 38, 1099 (1981), Glass et al., Science 265, 1389 (1994))
- VZV (Varizella Zoster Virus)-Antigen  
(Straus et al., Ann. Intern. Med. 109, 438 (1988), Gershon, Pediatr. Infect. Dis. 2, 171 (1991), Kinchington et al., J. Virol. 64, 4540 (1990))

- CMV (Cytomegalo-Virus)-Antigen  
(Plotkin, Science 265, 1383 (1994))
- Masern-Virus-Antigen  
(Katz und Kellin, Science 265, 1391 (1994))
- HPV (Humanes Papillomvirus)-Antigen  
(Tindl und Frazer, Curr. Topics Microbiol. Immunol. 186, 217 (1994))
- HBV (Hepatitis B-Virus)-Antigen  
(Valenzuela et al., Nature 280, 815 (1979), Heerman et al., J. Virol. 52, 396 (1984))
- HCV (Hepatitis C-Virus)-Antigen  
(Cerny et al., Curr. Topics Microbiol. Immunol. 189, 169 (1994), Esteban et al., Progr. Liver Dis. 10, 253 (1992), Jung et al., Eur. J. Clin. Invest. 24, 641 (1994))
- HDV (Hepatitis D-Virus)-Antigen  
(Iwarson, Scand. J. Infect. Dis. 24, 129 (1992), Consolo et al., Nephron. 61, 251 (1992))
- HEV (Hepatitis E-Virus)-Antigen  
(Iwarson, Scand. J. Infect. Dis. 24, 129 (1992), Consolo et al., Nephron. 61, 251 (1992))
- HAV (Hepatitis A-Virus)-Antigen  
(d'Hondt, Vaccine 10, 48 (1992), Andre, J. Infect. Dis. 171, 33 (1995), Lemon et al., Vaccine 10, 40 (1992), Melnick et al., Vaccine 10, 24 (1992), Flehmig, Baillieres Clin. Gastroenterol. 4, 707 (1990))
- Vibrio Cholera-Antigen  
(Levine und Kaper, Vaccine 11, 207 (1993))
- Borrelia Burgdorferi-Antigen  
(Schaible et al., Immunol. Letters 36, 219 (1993), Wallich et al., Lab. Med. 17, 669 (1993))
- Helicobacter pylori-Antigen  
(Crabtree et al., Lancet 338, 332 (1991), Blaser, J. Infect. Dis. 161, 626 (1990), Cover und Blaser, J. Biol. Chem. 267, 10570 (1993), Cover et al., Infect. Immunol. 58, 603 (1990), Dunn et al., J. Biol. Chem. 265, 9464 (1990), Dunn et al., Infect. Immunol. 60, 1946 (1992), Lage et al., Acta Gastroenterol. Belg. 56 (suppl.), 61 (1993), Mobley et al., Scand. J. Gastroint. 26 (suppl. 187), 39 (1991))
- Malaria-Antigen

(Nussenzweig und Long, Science 265, 1381 (1994), Maurice, Science 267, 320 (1995), Enders et al., Vaccines 10, 920 (1992), Knapp et al., Infect. Imm. 60, 2397 (1992))

Zu derartigen Wirksubstanzen im Sinne der Erfindung gehört jedoch auch die DNA eines Antiidiotyp-Antikörpers oder seiner Antigen-bindenden Fragmente, dessen Antigenbindungsstrukturen, die "complementary determining regions", Kopien der Protein- oder Kohlenhydratstruktur des Neutralisationsantigens des Infektionserregers darstellen.

Derartige Antiidiotyp-Antikörper können besonders Kohlenhydratantigene bei bakteriellen Infektionserregern ersetzen.

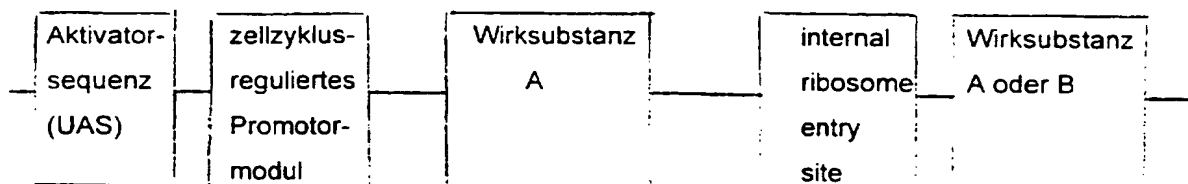
Derartige antiidiotypische Antikörper und ihre Spaltprodukte wurden von Hawkins et al. (J. Immunother. 14, 273 (1993)) und Westerink und Apicella (Springer Seminars in Immunopathol. 15, 227 (1993)) übersichtlich beschrieben.

### **8.3. Kombination gleicher oder unterschiedlicher Wirksubstanzen für die Therapie oder Prophylaxe von Infektionserkrankungen**

Gegenstand der Erfindung ist desweiteren ein Wirkstoff, in welchem eine Kombination der DNA-Sequenzen von gleichen Wirksubstanzen (A,A) oder unterschiedlichen Wirksubstanzen (A,B) vorliegt. Zur Expression von zwei Sequenzen ist vorzugsweise die cDNA einer "internal ribosome entry site" (IRES) als regulatorisches Element zwischengeschaltet.

Derartige IRES wurden beispielsweise von Montford und Smith (TIG 11, 179 (1995), Kaufman et al., Nucl. Acids Res. 19, 4485 (1991), Morgan et al., Nucl. Acids Res. 20, 1293 (1992), Dirks et al., Gene 128, 247 (1993), Pelletier und Sonenberg, Nature 334, 320 (1988) und Sugitomo et al., BioTechn. 12, 694 (1994) beschrieben.

So kann die cDNA der IRES-Sequenz des Poliovirus (Position  $\leq 140$  bis  $\geq 630$  des 5' UTR (Pelletier und Sonenberg, Nature 334, 320 (1988)) zur Verknüpfung der DNA der viralen Substanz A (am 3' Ende) und der DNA der antiviralen Substanz B (am 5' Terminus) verwendet werden.



Ein derartiger Wirkstoff weist je nach Kombination additive (A+A, A+B1) oder synergistische Wirkung im Sinne der Erfindung auf.

So können beispielsweise für die Therapie von Viruserkrankungen zwei gleiche oder zwei unterschiedliche antivirale Wirksubstanzen miteinander kombiniert werden.

Bei der Prophylaxe von Infektionserkrankungen können mehrere Wirksubstanzen, die für unterschiedliche Antigene eines Infektionserregers oder unterschiedlicher Infektionserreger kodieren, miteinander kombiniert werden. Des weiteren kann die Wirksubstanz, die für das Antigen eines Infektionserregers kodiert, kombiniert werden mit einer Wirksubstanz, die kodiert für ein Cytokin oder einen Cytokinrezeptor.

Die sich so (nach Injektion des Wirkstoffes) gleichzeitig mit dem Infektionserregerantigen bildenden Cytokine oder Cytokinrezeptoren können Einfluß auf die Art und Stärke der sich entwickelnden Immunreaktion nehmen.

DNA-Sequenzen für Cytokine und Cytokinrezeptoren, welche die humorale Immunreaktion verstärken, sind bereits unter 6.2.d) beschrieben, solche zur Verstärkung der zellulären Immunreaktion unter 6.2.a) und 6.2.c).

DNA-Sequenzen für Cytokine, welche die Immunreaktion insgesamt verstärken, sind beispielsweise:

- IL-1 $\alpha$

(Fenton, Int. J. Immunopharm. 14, 401 (1992), Furntani et al., Nucl. Acids Res. 14, 3167 (1986), Lafage et al., Blood 73, 104 (1989), March et al., Nature 315, 641 (1985))

- IL-1 $\beta$   
(Bensi et al., Gene 52, 95 (1987), Auron et al., PNAS 81, 7907 (1984), Clark et al., Nucl. Acids Res. 14, 7897 (1986))
- IL-2  
(Fletscher et al., Lymphok. Res. 6, 45 (1987), Matsui et al., Lymphokines 12, 1 (1985), Tanaguchi et al., Nature 302, 305 (1983))
- GM-CSF  
(Gough et al., Nature 309, 763 (1984), Nicola et al., J. Biol. Chem. 254, 5290 (1979), Wong et al., Science 228, 810 (1985))

#### 8.4. Auswahl der Liganden für Infektionserreger

Zur Therapie von Infektionserkrankungen gehören zu den Liganden Antikörper oder Antikörperfragmente, gerichtet gegen die Infektionserreger. Beispielsweise sind dies bei Virusinfektionen die Virusantigene exprimiert auf der Zellmembran von virusinfizierten Zellen.

Derartige Antikörper sind beispielsweise für mit folgenden Viren infizierte Zellen beschrieben worden:

- \* HBV (Shonval et al., PNAS USA 79, 650 (1982), Intercell. Intracell. Comm. 2, 221 (1986), Klein et al., Virus Genes 5, 157 (1991))
- \* HCV (Takahashi et al., Virol. 191, 431 (1992))
- \* HSV (Sanchez-Pescador et al., J. Infect. dis. 166, 623 (1992))
- \* HPV (Doorbar et al., Virol. 187, 353 (1992))
- \* HIV (Nishino et al., Vaccine 10, 677 (1992))
- \* EBV (Thorley-Lawson et al., Cell 30, 415 (1982))
- \* HTLV (Robert-Garoff et al., J. Virol. 53, 214 (1985), Matsushita et al., J. Virol. 62, 2107 (1988)).

Desweiteren gehören zu den Liganden auch monoklonale oder polyklonale Antikörper oder Antikörperfragmente, die mit ihren konstanten Domänen an Fc- $\gamma$ - oder -Rezeptoren von Immunzellen binden (Rojanasakul et al., Pharm. Res. 11, 1731 (1994)).

Die murinen monoklonalen Antikörper sind bevorzugt in humanisierter Form

einzusetzen. Die Humanisierung erfolgt in der von Winter et al. (Nature 349, 293 (1991)) und Hoogenbooms et al. (Rev. Tr. Transfus. Hemobiol. 36, 19 (1993)) dargestellten Weise. Antikörperfragmente werden entsprechend dem Stand der Technik hergestellt, beispielsweise in der von Winter et al. (Nature 349, 293 (1991)), Hoogenboom et al. (Rev. Tr. Transfus. Hemobiol. 36, 19 (1993)), Girol (Mol. Immunol. 28, 1379 (1991)) und Huston et al. (Int. Rev. Immunol. 10, 195 (1993)) beschriebenen Weise.

Zu den Liganden gehören des weiteren alle Substanzen, welche an Membranstrukturen oder Membranrezeptoren auf der Oberfläche von virusinfizierten Zellen binden. Beispielsweise gehören hierzu Wachstumsfaktoren, wie Zytokine, EGF, TGF, FGF oder PDGF, oder deren Fragmente bzw. Teilsequenzen von ihnen, die an Rezeptoren exprimiert durch derartige Zellen binden.

Hierzu gehören des weiteren Liganden, welche an Zellmembranstrukturen binden, welche selektiv sind für bestimmte Gewebe. Hierzu zählen beispielsweise:

<u>Membranstruktur</u>	<u>Liganden</u>	<u>Gewebezellen</u>
Asialoglycoprotein-Rezeptor	Asialoorosomucoid Neoglycoprotein Galactose	Leberzellen
Transferrin-Rezeptor	Transferrin	Leber, andere Gewebezellen
Insulin-Rezeptor	Insulin	Leberzelle, andere Gewebezellen
Mannose 6-Phosphat-Rezeptor	Mannose	Makrophagen in Milz, Leber, Lunge, andere Gewebe
Fc- $\gamma$ -Rezeptoren	Immunglobulin G	retikuloendo- theliales System, andere Gewebe

Diese Liganden und Membranstrukturen sind übersichtlich bei Perales et al.,



Eur. J. Biochem. 226, 255 (1994) beschrieben.

Für die Prophylaxe von Infektionserkrankungen sind als Liganden alle Substanzen geeignet, welche an Zellmembranstrukturen von Makrophagen und/oder Lymphozyten binden. Derartige Liganden wurden bereits im Abschnitt 6.4. beschrieben.

#### **8.5. Auswahl der Liganden für einen Wirkstoff zur Prophylaxe von Infektionserregern**

Als Liganden für virale und nicht-virale Vektoren, beispielsweise in kolloidalen Dispersionen oder in Polylysin-Ligand-Komplexen werden Substanzen bevorzugt, welche an die Oberfläche von Makrophagen und/oder Lymphozyten spezifisch binden. Derartige Liganden sind bereits im Abschnitt 6.4. beschrieben worden.

Diese Liganden sind Bestandteil der Vektoren. Im Sinne dieser Erfindung können jedoch auch Liganden den Vektoren zugemischt werden. Für diese Mischung sind besonders Liganden zu verwenden, welche in der Lage sind, Makrophagen und/oder Lymphozyten zu aktivieren. Hierzu gehören beispielsweise:

- Cytokine wie beispielsweise IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IFN- $\gamma$ , GM-CSF oder M-CSF  
(Hadden, Int. J. Immunopharm. 16, 703 (1994))
- lösliche Cytokinrezeptoren wie beispielsweise IL-4-Rezeptor.

Alternativ oder zusätzlich können Adjuvantien hinzugemischt werden. Hierzu gehören beispielsweise:

- synthetische Adjuvantien  
(Übersichten bei: Parant, Int. J. Immunopharm. 16, 445 (1994), Cernescu, Int. J. Immunopharm. 16, 369 (1994))
- Liposomen  
(Übersichten bei: Alving, J. Immunol. Methods 140, 1 (1991) und BBA 1113, 307 (1992), Sato und Sanamoto, Prog. Lipid Res. 31, 345 (1992))

- Lipopolysaccharide oder Lipid A  
(Übersicht bei: Alving, Immunobiol. 187, 430 (1993))
- bioabbaubare Polymere wie beispielsweise
  - \* Poly (DL-Lactide-Co-Glycolide)  
(Eldridge et al., Infect. Immun. 59, 2978 (1991))
  - \* Pseudolatexes  
(Coffin und McGiulty, Pharmaceut. Res. 9, 200 (1992))
- Muramyl-dipeptide  
(Morin et al., Int. J. Immunopharm. 16, 451 (1994)).

Desweiteren ist es im Sinne der Erfindung, Substanzen den Vektoren zuzumischen, welche sie für eine Aufnahme über die Schleimhaut und für beispielsweise orale Immunisierung geeignet machen.

Derartige Substanzen und Formulierungen wurden von Walker (Vaccine 12, 387 (1994)) übersichtlich dargestellt.

#### 8.6. Herstellung des Wirkstoffes gegen Virusinfektionen

Die Herstellung des erfindungsgemäßen Wirkstoffes wird anhand folgender Beispiele näher beschrieben:

##### a) Konstruktion des chimären Promotors HIV-LTR-TAR-CDE-CHR-Inr

Der HIV-LTR-TAR Promotor (Position  $\leq -453$  bis  $\geq +80$ , (Rosen et al., Cell 41, 813 (1985)) wird an seinem 3' Ende mit dem 5'-Terminus des CDE-CHR-Inr Moduls des humanen cdc25C-Gens (Position  $\leq -20$  bis  $\geq +121$ , Lucibello et al., EMBO J., 14, 132 (1995)) verknüpft (Fig. 13). Die Verknüpfung erfolgt mit Hilfe von dem Fachmann bekannten und käuflichen Enzymen.

##### b) Konstruktion eines Plasmids enthaltend den chimären Promotor HIV-LTR-TAR-CDE-CHR-Inr im zentralen Bestandteil des Wirkstoffes

Die beschriebene chimäre Promotormodul-Transkriptionseinheit wird an ihren 3' Enden mit dem 5'-Terminus einer DNA, die den kompletten kodierenden Bereich des Interferon  $\alpha$ -1 (Position  $\leq -69$  bis  $\geq +501$ , (Streuli

et al., Science 209, 1343 (1980)) enthält, verknüpft. Diese DNA enthält auch die für eine Sekretion notwendige Signalsequenz. Transkriptionskontrollenheiten und die DNA für Interferon $\alpha$ -1 werden in pUC19/19 oder Bluescript-abgeleiteten Plasmidvektoren einkloniert, die direkt oder in kolloidalen Dispersionssystemen für eine in vivo Applikation genutzt werden können. Alternativ können die chimären Gene in virale Vektoren oder andere geeignete Vektoren transferiert und injiziert werden.

#### c) Konstruktion eines Plasmids enthaltend zwei Gene für Wirksubstanzen

Die, wie unter a) beschriebene, HIV-LTR-TAR-CDE-CHR-Inr-Transkriptionseinheit wird an ihrem 3' Ende mit dem 5' Ende der DNA für das Interferon $\alpha$ -1 (Position  $\leq -69$  bis  $\geq +501$ ; Streuli et al., Science 209, 1343 (1980)) verknüpft. Die Verknüpfung erfolgt mit Hilfe von dem Fachmann bekannten und käuflichen Enzymen.

Das 3' Ende der DNA für Interferon $\alpha$ -1 wird nunmehr verknüpft mit dem 5' Ende der cDNA der internal ribosome entry site (Position  $\leq 140$  bis  $\geq 630$ ; Pelletier und Sonenberg, Nature 334, 320 (1988)) und ausschließend deren 3' Ende mit dem 5' Ende der DNA für das Rev-bindende Protein (RbP9-27) verknüpft (Position  $\leq 1$  bis  $\geq 378$ , Reid et al., PNAS USA 86, 840 (1989)) (siehe Fig. 13). Dieser so hergestellte Wirkstoff wird anschließend in puc18/19 oder in Bluescript-abgeleiteten Plasmidvektoren einkloniert, die direkt oder in kolloidalen Dispersionssystemen für eine in vivo Applikation genutzt werden können. Alternativ können die chimären Gene in virale Vektoren oder andere geeignete Vektoren transferiert und injiziert werden.

#### 9) Herstellung eines Wirkstoffes gegen Leukämien (und Lymphome)

##### 9.1. Auswahl der Aktivatorsequenz für Leukämien

Als Aktivatorsequenz (UAS = upstream activator sequence) ist eine Nukleotidsequenz (Promotor- oder Enhancersequenz) vorgesehen, mit der Transkriptionsfaktoren, gebildet oder aktiv in Leukämiezellen, interagieren.

Im Sinne dieser Erfindung zählen zu den bevorzugten Aktivatorsequenzen

jedoch genregulatorische Sequenzen bzw. Elemente aus Genen, die besonders in Leukämiezellen gebildete Proteine kodieren.

Hierzu zählen beispielsweise die in nachfolgenden Literaturziten aufgeführten Promotorsequenzen für Gene, die für folgende Proteine kodieren:

- c-myc  
(Bentley et al., Mol. Cell. Biol. 6, 3481 (1986), Lang et al., Oncogene 6, 2067 (1991), Meulia et al., Mol. Cell. Biol. 12, 4590 (1992), Desjardins, Mol. Cell. Biol. 13, 5710 (1993))
- HSP-70  
(Taira et al., BBA 1130, 166 (1992))
- bcl-1/cyclin D-1  
(Herber et al., Oncogene 9, 1295 (1994))
- bcl-2  
(Young et al., Mol. Cell. Biol. 13, 3686 (1993))
- IL-6  
(Droogmans et al., DNA-Sequence 3, 115 (1992), Mori et al., Blood 84, 2904 (1994), Liberman et al., Mol. Cell. Biol. 10, 2327 (1990), Ishiki et al., Mol. Cell. Biol. 10, 2757 (1990))
- IL-10  
(Kim et al., J. Immunol. 148, 3618 (1992), Kube et al., Cytokine 7, 1 (1995), Platzer et al., DNA-Sequence 4, 399 (1994), Kube et al., Cytokine 7, 1 (1995))
- NF $\alpha$ , TNF $\beta$   
(Sidhu et al., Pharmac. Ther. 57, 79 (1993), Vilcek et al., J. Biol. Chem. 266, 7313 (1991), Tahashiba et al., Gene 131, 307 (1993), Nedwin et al., Nucl. Acids Res. 13, 6361 (1985), Paul et al., J. Virol. 64, 5412 (1990), Shakhov et al., J. Exp. Med. 171, 35 (1990), van der Ake et al., Nucleic Acids Res. 21, 5636 (1993)).

Desweiteren gehören hierzu Bindungssequenzen für Proteine, gebildet von folgenden Genen:

- HOX-11  
(Dear et al., PNAS USA 90, 4431 (1990))

- BCR-Abl  
(Zhu et al., Nucl. Acid Res. 18, 7119 (1990), Shah et al., Mol. Cell. Biol. 11, 1854 (1991))
- E2A-PBX-1  
(Monica et al., Mol. Cell. Biol. 14, 8304 (1994), Numata et al., Leukemia 7, 1441 (1993), von Dijk et al., PNAS USA 90, 6061 (1993))
- PML-RARA  
(Promyelocytic Leukemia - Retinoic Acid Receptor)  
(Potter et al., Leukemia 7, 1302 (1993), Yoshida et al., Genes, Chromosomes Cancer 12, 37 (1995), Brand et al., Nucl. Acids Res. 18, 6799 (1990))
- c-myc  
c-myc-Proteine binden an und aktivieren Multimere der als Myc E-Box bezeichneten Nukleotidsequenz (5'-GGAAGCAGACCACGTGGTCT-GCTTCC-3')  
(Blackwood und Eisenman, Science 251, 1211 (1991))

## 9.2. Auswahl der Wirksubstanz für Leukämien

Als Wirksubstanz im Sinne der Erfindung ist eine DNA-Sequenz zu verstehen, deren exprimiertes Protein die Proliferation von Zellen, insbesondere auch von Leukämiezellen, inhibiert. Zu diesen Zellzyklusinhibitoren gehören beispielsweise die DNA-Sequenzen für inhibitorische zytostatische und zytotoxische Proteine und Enzyme, wie sie bereits im Abschnitt 6.2. e-g) beschrieben wurden.

Als Zellzyklusinhibitor ist des weiteren eine DNA-Sequenz zu verstehen, welche ein Protein exprimiert, welches direkt oder indirekt eine zytostatische oder zytotoxische Wirkung auf Leukämien aufweist. Zu derartigen Proteinen zählen beispielsweise:

- IL-1 $\alpha$   
(Fenton, Int. J. Immunopharm. 14, 401 (1992), Furntani et al., Nucl. Acids Res. 14, 3167 (1986), Lafage et al., Blood 73, 104 (1989), March et al., Nature 315, 641 (1985))
- IL-1 $\beta$

- 68 -

- (Bensi et al., Gene 52, 95 (1987), Auron et al., PNAS 81, 7907 (1984), Clark et al., Nucl. Acids Res. 14, 7897 (1986))
- IL-2  
(Fletscher et al., Lymphok. Res. 6, 45 (1987), Matsui et al., Lymphokines 12, 1 (1985), Tanaguchi et al., Nature 302, 305 (1983))
  - IL-4  
(Lee et al., PNAS 83, 2061 (1986); Paul, Blood 77, 1859 (1991), Yokota et al., PNAS USA 83, 5894 (1986), von Leuven et al., Blood 73, 1142 (1989), Arai et al., J. Immunol. 142, 274 (1989))
  - IL-10  
(Vieira et al., PNAS USA 88, 1172 (1991), Moore et al., Science 248, 1230 (1990), Kim et al., J. Immunol. 148, 3618 (1992))
  - IL-12  
(Gubler et al., PNAS USA 88, 4143 (1991), Wolf et al., J. Immunol. 146, 3074 (1991), Kobayashi et al., J. Exp. Med. 170, 827 (1989), Gately et al., J. Immunol. 147, 874 (1991), Schoenhaut et al., J. Immunol. 148, 3433 (1992),
  - Interferone, wie beispielsweise
    - \* IFN $\alpha$  (Henco et al., J. Mol. Biol. 185, 227 (1985), Pestka et al., Annu. Rev. Biochem. 56, 727 (1987), Weissmann et al., Phil. Trans. R. Soc. Lond. B299, 7 (1982), Goeddel et al., Nature 290, 20 (1981))
    - \* IFN $\beta$  (Sen et al., J. Biol. Chem. 267, 5017 (1992), Mark et al. EP 192.811, EP 234.599, US 4588.585
    - \* IFN- $\gamma$  (Gray et al., Nature 295, 503 (1982), Yip et al., PNAS USA 79,
  - Leukemia inhibitory Factor (LIF)  
(Metcalf, Int. J. Cell Clon. 9, 85 (1991), Sutherland et al., Leuk. 3, 9 (1989), Gough et al., PNAS USA 85, 2623 (1988), Gough et al., Ciba Found. Symp. 167, 24 (1992), Stahl et al., J. Biol. Chem. 265, 8833 (1990), Rathjan et al., Cell 62, 1105 (1990))
  - TNF  
(Porter, TiBTech 9, 158 (1991); Sidhu et al., Pharmac. Ther. 57, 79 (1993)) im speziellen
    - \* TNF $\alpha$  (Beutler et al., Nature 320, 584 (1986), Kriegler et al., Cell 53, 45 (1988))
    - \* TNF $\beta$  (Gray et al., Nature 312, 721 (1984), Li et al., J. Immunol.

138, 4496 (1987), Aggarwal et al., J. Biol. Chem. 260, 2334 (1985))

- TGF $\beta$

(Kehrl et al., J. Immunol. 137, 3855 (1986), J. Exp. Med. 163, 1037 (1986), Ten Dijke et al., PNAS USA 85, 4715 (1988), Derynck et al., EMBO J. 7, 3737 (1988), Massague, Ann. Rev. Cell Biol. 6, 597 (1990), Kondiah et al., J. Biol. Chem. 265, 1089 (1990), Garnier et al., J. Mol. Biol. 120, 97 (1978))

- Oncostatin M

(Brown et al., J. Immunol. 147, 2175 (1991); Grove et al., J. Biol. Chem. 266, 18194 (1991); Hamilton et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 180, 652 (1991), Malik et al., Mol. Cell. Biol. 9, 2847 (1989), Kallstad et al., J. Biol. Chem. 266, 8940 (1991)

Als Wirksubstanz im Sinne der Erfindung können jedoch auch DNA-Sequenzen von Fusionsproteinen zwischen den aufgeführten Cytokinen, Wachstumsfaktoren oder dem extrazellulären Teil der Rezeptoren zum einen und dem Fc-Teil des menschlichen Immunglobulins zum anderen Verwendung finden. Derartige DNA-Sequenzen und ihre Herstellung wurden in der EP 0464 633 A1 beschrieben.

Die Auswahl des Zellzyklusinhibitors ist abhängig vom Typ der Leukämie.

- So sind IL-4 und IL-6 besonders antiproliferativ wirksam bei der B-CLL (von Kooten et al., Leuk. Lymph. 12, 27 (1993)).
- TGF $\beta$  inhibiert bevorzugt die Lymphozytenproliferation (Kehrl et al., J. Immunol. 143, 1868 (1989)).
- TNF, insbesondere TNF $\alpha$ , inhibiert myeloische Leukämiezellen (Porter, FEMS Microbiol. Immunol. 64, 193 (1990)) und Lymphomzellen (Sidhu et al., Pharm. Therp. 57, 79 (1993)).
- IFN- $\gamma$  inhibiert Myelomzellen (Portier et al., Blood 81, 3076 (1993)).
- IFN $\alpha$  inhibiert die Haarzell-Leukämie (Guterman, PNAS USA 91, 1198 (1994)), wie auch Non-Hodgkin Lymphome (Solal-Celigny et al, New Engl. J. Med. 329, 1608 (1993), CLL, T-CLL, CML und ALL (Guterman, PNAS USA 91, 1198 (1994), Dorr, Drugs 45, 177 (1993)).
- LIF inhibiert die Proliferation von CML Zellen (Metcalf, Int. J. Cell Clon. 9, 95

(1991)).

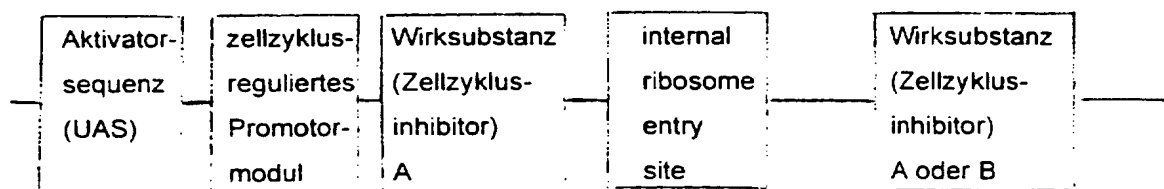
- IL-10 induziert Apoptose in B-CLL-Zellen (Fluchinger et al., J. Exp. Med. 179, 91 (1994)).

Andererseits können insbesondere IL-1, IL-2, IL-4, IL-12 oder Interferone durch Aktivierung von Immunzellen, benachbart den transduzierten Leukämiezellen eine Entzündungsreaktion auslösen (Fenton et al., Int. J. Immunopharm. 14, 401 (1992), Janssen et al., Cancer Immunol. Immunother. 39, 207 (1994), Kirchner, DMW 111, 64 (1986), Paul, Blood 77, 1859 (1991), Gateley et al., Cancer Invest. 11, 500 (1993)), welche die Leukämiezellen abtötet.

Voraussetzung für die Verwendung der DNA-Sequenz eines der aufgeführten Cytokine als Zellzyklusinhibitor im Wirkstoff ist jedoch, daß vor Gabe des Wirkstoffes geprüft wurde, daß für die Leukämiezellen des jeweiligen Patienten der ausgewählte Zellzyklusinhibitor kein Wachstumsfaktor darstellt.

### 9.3. Kombination gleicher oder unterschiedlicher Wirksubstanzen für Leukämien

Gegenstand der Erfindung ist des weiteren ein Wirkstoff, in welchem eine Kombination der DNA-Sequenzen von zwei gleichen Zellzyklusinhibitoren (A,A) oder zwei unterschiedlichen Zellzyklusinhibitoren (A,B) vorliegt. Zur Expression beider DNA-Sequenzen ist vorzugsweise die cDNA einer "internal ribosome entry site" (IRES) als regulatorisches Element zwischengeschaltet.



Derartige IRES wurden beispielsweise von Montford und Smith (TIB 11, 179 (1995), Kaufman et al., Nucl. Acids Res. 19, 4485 (1991), Morgan et al., Nucl. Acids Res. 20, 1293 (1992), Dirks et al., Gene 128, 247 (1993), Pelletier und Sonenberg, Nature 334, 320 (1988) und Sugitomo et al., BioTechn. 12, 694 (1994) beschrieben.

So kann die cDNA der IRES-Sequenz des Poliovirus (Position  $\leq 140$  bis  $\geq 630$



des 5' UTR) zur Verknüpfung der DNA des Zellzyklusinhibitor A (am 3' Ende) und der DNA des Zellzyklusinhibitors B (am 5' Terminus) verwendet werden.

Ein derartiger Wirkstoff weist je nach Kombination additive (A+A, A+b1) oder synergistische Wirkung im Sinne der Erfindung auf.

#### 9.4. Auswahl des Liganden für Leukämien

Als Liganden für virale Vektoren oder nicht-virale Vektoren, beispielsweise in Polylysin-Ligand-Konjugaten, werden Substanzen bevorzugt, welche an die Oberfläche von Leukämiezellen binden. Hierzu gehören Antikörper oder Antikörperfragmente, gerichtet gegen Membranstrukturen von Leukämiezellen. Eine große Anzahl derartiger monoklonaler Antikörper sind bereits für diagnostische und therapeutische Verfahren beschrieben worden (Übersichten bei Kristensen, Danish Medical Bulletin 41, 52 (1994), Schranz, Therapia Hungarica 38, 3 (1990), Drexler et al., Leuk. Res. 10, 279 (1986), Naeim, Dis. Markers 7, 1 (1989), Stickney et al., Current Op. Oncol. 4, 847 (1992), Drexler et al., Blut 57, 327 (1988), Freedman et al., Cancer Invest. 9, 69 (1991)). Je nach Typ der Leukämie sind als Liganden beispielsweise folgende monoklonale Antikörper oder deren antigenbindende Antikörperfragmente geeignet:

Zellen	Membran- antigen	monoklonalen Antikörper beschrieben von
AML	CD13	Kaneko et al., Leuk. Lymph. <u>14</u> , 219 (1994)
	-	Muroi et al., Blood <u>79</u> , 713 (1992)
	CD14	Ball, Bone Marrow Transplant. <u>3</u> , 387 (1988)
	CD15	Guyotat et al., Bone Marrow Transplant. <u>6</u> , 385 (1990) Campos et al., Eur. J. Cancer <u>28</u> , 37 (1992)

- 72 -

	CD33	Jurcic et al., Leukemia <u>9</u> , 244 (1995), Caron et al., Cancer <u>73</u> , 1049 (1994)
	CAMAL	Shellard et al., Exp. Hematol. <u>19</u> , 136 (1991)
	Sialosyl-Le	Muroi et al., Blood <u>79</u> , 713 (1992)
B-CLL	CD5	Kaminski et al., Cancer Treat. Res. <u>38</u> , 253 (1988) Tassone et al. Immunology Lett. <u>39</u> , 137 (1994)
	CD1c CD23	Orazi et al., Eur. J. Haematol. <u>47</u> , 28 (1991)
	Idiotypen und Isotypen der Membranimmun- globuline	Schroeder et al., Immunol. Today <u>15</u> , 289 (1994)
T-CLL	CD33 M38	Imai et al., J. Immunol. <u>151</u> , 6470 (1993)
	IL-2-Rezeptoren T-Zell-Rezeptoren	Waldmann et al., Blood <u>82</u> , 1701 (1993)
ALL	CALLA	Morishima et al., Bone Marrow Trans- plant. <u>11</u> , 255 (1993)
	CD19	Anderson et al., Blood <u>80</u> , 84 (1993)
	Non-Hodgkin Lymphoma	Okazaki et al., Blood <u>81</u> , 84 (1993)

Die murinen monoklonalen Antikörper sind bevorzugt in humanisierter Form einzusetzen. Die Humanisierung erfolgt in der von Winter et al. (Nature 349,

293 (1991)) und Hoogenboom et al. (Rev. Tr. Transfus. Hemobiol. 36, 19 (1993)) dargestellten Weise. Antikörperfragmente werden entsprechend dem Stand der Technik hergestellt, beispielsweise in der von Winter et al., Nature 349, 293 (1991), Hoogenboom et al., Rev. Tr. Transfus. Hemobiol. 36, 19 (1993), Girol, Mol. Immunol. 28, 1379 (1991) oder Huston et al., Int. Rev. Immunol. 10, 195 (1993) beschriebenen Weise.

Zu den Liganden gehören desweiteren alle Wirkstoffe, welche an Membranstrukturen oder Membranrezeptoren von Leukämiezellen binden. Beispielsweise gehören hierzu Wachstumsfaktoren oder deren Fragmente bzw. Teilsequenzen von ihnen, die an Rezeptoren exprimiert durch Leukämiezellen binden.

Derartige Wachstumsfaktoren wurden bereits beschrieben (Übersichten bei Cross et al., Cell 64, 271 (1991), Aulitzky et al., Drugs 48, 667 (1994), Moore, Clin. Cancer Res. 1, 3 (1995), Van Kooten et al., Leuk. Lymph. 12, 27 (1993)). Beispielsweise gehören zu ihnen:

- IFN $\alpha$  bei Non-Hodgkin Lymphomen  
(Hiddemann et al., Blood Rev. 8, 225 (1994))
- IL-2, besonders bei T-Zell-Leukämien  
(Waldmann, J. Nat. Cancer Inst. 81, 914 (1989), Kreitman et al., Int. J. Immunopharm. 14, 465 (1992))
- FGF bei T-Zell-, monozytären, myeloiden, erythroiden und megakaryoblastischen Leukämien  
(Armstrong et al., Cancer Res. 52, 2004 (1992))
- TGF $\beta$  bei Leukämien  
(Keller et al. J. Cell Biochem. 39, 79 (1989))
- Retinoide, z.B. "Retinoic acid" bei akuter promyelozytärer Leukämie  
(Cornic et al., Anticancer Res. 14, 2339 (1994)).

## 9.5. Herstellung des Wirkstoffes für Leukämien

Die Herstellung des Wirkstoffes wird an folgenden Beispielen verdeutlicht:

### a) Konstruktion des chimären Promotors Myc E-Box-CDE-CHR-Inr

5 Kopien der humanen Myc E-Box (Nukleotidsequenz 5'-GGAAGCAG-ACCACGTGGTCTGCTTCC-3'; Blackwood und Eisenman, Science 251, 1211 (1991)) werden in 5'-3' Orientierung miteinander verknüpft und an ihrem 3' Ende mit dem 5' Terminus des CDE-CHR-Inr Moduls des humanen cdc25-Gens (Position -20 bis  $\geq$  +121 der von Lucibello et al., EMBO J. 14, 132 (1995)) verbunden (siehe Fig. 14).

Die Verknüpfungen erfolgen mit Hilfe von dem Fachmann bekannten und käuflichen Enzymen. Die so hergestellte chimäre Myc E-Box-Promotormodul-Transkriptionseinheit wird an ihrem 3' Ende mit dem 5' Terminus einer DNA, die den kompletten kodierenden Bereich der humanen  $\beta$ -Glucuronidase (DNA Position  $\leq$  27 bis  $\geq$  1982, der von Oshima et al., PNAS USA 84, 684 (1987)) enthält, verknüpft (siehe Fig. 14).

Diese DNA enthält auch die für eine Sekretion notwendige Signalsequenz (22N-terminale Aminosäure). Zur Erleichterung der zellulären Ausschleusung ist diese Signalsequenz bevorzugt auszutauschen gegen die Signalsequenz des Immunglobulins (Position  $\leq$  63 bis  $\geq$  107; Riechmann et al., Nature 332, 323 (1988), siehe Fig. 15). Transkriptionskontrolleinheiten und die DNA für die humane  $\beta$ -Glucuronidase werden in pUC18/19 oder Bluescript-abgeleiteten Plasmidvektoren einkloniert, die direkt oder in kolloidalen Dispersionssystemen für eine in vivo Applikation genutzt werden können. Alternativ können die chimären Gene in virale Vektoren oder andere geeignete Vektoren transferiert und injiziert werden.

#### 10) Wirksamkeit des Wirkstoffes

Ein Wirkstoff gemäß der vorliegenden Erfindung ermöglicht nach lokaler (z.B. in Gewebe, Körperhöhlen, Magen-Darm-Trakt, Gewebezwischenräumen, Gelenkspalten oder Cytokine) oder nach systemischer, bevorzugt intravenöser oder intraarterieller Gabe eine vorwiegende, wenn nicht ausschließliche Wirkung an den Zielzellen, da durch die Kombination aus gewebespezifischer Aktivatorsequenz und zellzyklusreguliertem Promotormodul gewährleistet ist, daß die Wirksubstanz überwiegend oder ausschließlich in sich teilenden Zielzellen exprimiert wird.

So kann eine langanhaltende Behebung von haematopoietischen Cytopenien und eine deutliche Linderung von Allergien und Autoimmunerkrankungen erreicht werden. Bei chronischen Gelenkentzündungen bewirkt die intraartikuläre Injektion des Wirkstoffes eine Hemmung der Synovialzellproliferation. Bei chronischen Virusinfektionen ist durch den Wirkstoff eine Therapie möglich. Desweiteren bietet der Wirkstoff eine wirksame und sichere Möglichkeit der Impfung gegen Infektionserreger. Bei Leukämien ist die Chance für eine therapeutische Wirkung gegeben.

Da der Wirkstoff sowohl durch seine Zell- als auch Zellzyklusspezifität ein hohes Maß an Sicherheit verspricht, kann er auch in hohen Dosierungen und, falls notwendig, mehrmals in Abständen von Tagen, Wochen oder Monaten zur Prophylaxe oder zur Therapie angewandt werden.

- 76 -

Legende zu Fig. 1 - 15:

Fig. 1:

Nukleotidsequenz des *cdc25C* - Promotorbereichs mit den *in vivo* gefundenen Proteinbindungsstellen (genomisches DMS Footprinting; • (gefüllte Kreise): vollständiger konstitutiver Schutz; o (offene Kreise): partieller konstitutiver Schutz; \* (Sternchen): zellzyklusregulierter, G1-spezifischer Schutz). CBS: constitutive binding site; CDE: cell cycle-dependent element. Grau unterlegte Bereiche zeigen die Y<sub>C</sub>-Boxen (NF-Y Bindestellen) an. Startstellen sind durch gefüllte Quadrate markiert.

Fig. 2:

Derepression des *cdc25C*-Promotors spezifisch in G<sub>0</sub> durch Mutation des *cdc*.

Fig. 3:

Schematische Darstellung der *cdc25C* Enhancer-Regulation durch das CDE.

Fig. 4:

G<sub>0</sub> / G<sub>1</sub> - spezifische Repression des SV40-Enhancers durch das CDE.

Fig. 5:

Homologien im CDE-CHR-Bereich und den 5' gelegenen Y<sub>C</sub>-Boxen in den *cdc25C*, cyclin A und *cdc2*-Promotoren

Fig. 6:

Chimäre Promotoren zur Expression von Thrombopoietin  
Positionsangaben beziehen sich auf folgende Literatur:

- 77 -

SCF-Rezeptor-Promotor:	Yamamoto et al., Jpn. J. Cancer Res. <u>84</u> , 1136 (1993)
IL-1-Rezeptor-Promotor:	Ye et al., PNAS USA <u>90</u> , 2295 (1993)
IL-3-Rezeptor ( $\alpha$ )-Promotor:	Miyajima et al., Blood <u>85</u> , 1246 (1995)
GM-CSF-Rezeptor ( $\alpha$ )-Promotor:	Nakagawa et al., J. Biol. Chem. <u>269</u> , 10905 (1994)
$\beta$ -Kette (IL-3-Rez./GM-CSF):	Gorman et al., J. Biol. Chem. <u>267</u> , 15842 (1992)
CDE-CR-Inr:	Lucibello et al., EMBO J. <u>14</u> , 132 (1995)
IL-3:	Yang et al., Cell <u>47</u> , 3 (1986)
internal ribosome entry site:	Pelletier und Sonenberg, Nature <u>334</u> , 320 (1988)
Thrombopoietin:	de Sauvage et al., Nature <u>369</u> , 533 (1994)

Fig. 7:

Chimäre Promotoren für die Prophylaxe oder Therapie von Autoimmunerkrankungen und/oder Allergien.

Positionsangaben beziehen sich auf folgende Literatur:

IL-2-Promotor:	Williams et al., J. Immunol. <u>141</u> , 662 (1988)
IL-1-Rezeptor-Promotor:	Ye et al., PNAS USA <u>90</u> , 2295 (1993)
CDE-CHR-Inr:	Lucibello et al., EMBO J. <u>14</u> , 132 (1995)
IL-10:	Moore et al., Science <u>248</u> , 1230 (1990)
internal ribosome entry site:	Pelletier und Sonenberg, Nature <u>334</u> , 320 (1988)
$\beta$ -Glucuronidase:	Oshima et al., PNAS USA <u>84</u> , <u>685</u> (1985)
Signalsequenz Immunglobulin:	Riechmann et al., Nature <u>332</u> , 323 (1988)

Fig. 8:

Schematische Darstellung der Exonuklease III-Verkürzungen des 5'-flankierenden TIMP-3-Genbereichs. Zur Erleichterung der Sequenzierung wurden annähernd 1600 bp des 5'-flankierenden TIMP-3-Genbereichs durch Behandlung mit Exonuklease III vom 5'-Ende her verkürzt und in den

Bluescript SK(-)-Vektor kloniert. Die Namen der Plasmide bezeichnen ihre 5'-Verkürzung (z.B.  $\Delta$ -1300 enthält 1300 bp 5' der Transkriptionsstartstelle). Die Transkriptionsstartstelle ist mit +1 markiert.

Fig. 9:

Nukleotidsequenz von 500 bp menschlichen TIMP-3-Promotors sowie 101 bp der 5'-untranslatierten Region. GC-Boxen (Sp1-Bindungsstellen), zwei Halbseiten einer möglichen NF1-Bindungsstelle sowie ein der C/EBP-Bindungsstelle ähnelndes Element sind markiert. Die Transkriptionsstartstelle ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

Fig. 10:

Induktionskinetik des  $\Delta$ -1010-TIMP-3-Promotor-Luziferase-konstrukts nach Stimulation ruhender NIH3T3-Zellen mit 20 % FKS.

Graphische Darstellung. Nach DEAE-Transfektion von 7  $\mu$ g Plasmid-DNA wurden die NIH3T3<sup>RT</sup>-Zellen für 40 h in serumfreiem Medium inkubiert, mit 20 % FKS stimuliert und zu den angegebenen Zeitpunkten die Expression des Luziferase-Reportergens bestimmt.

Fig. 11:

Transiente Expressionsanalyse 5'-verkürzter TIMP-3-Promotor-Luziferasekonstrukte in normal wachsenden, ruhenden und serumstimulierten NIH3T3<sup>RT</sup>-Zellen.

Die Plasmide wurden entsprechend ihrer Verkürzungen bezeichnet (s. Fig. 8)

(a) Analyse in normal wachsenden NIH3T3-Zellen

(b) Analyse der gleichen Konstrukte wie in (a) in ruhenden versus für 4 h mit 20 % FKS stimulierten NIH3T3-Zellen.

Die Experimente in (a) und (b) wurden, wie in Tab. 1 beschrieben, dreimal mit unabhängig voneinander präparierten Plasmid-DNAs durchgeführt. Standardabweichungen sind als Balken dargestellt. Ein Fehlen der Balken indiziert eine sehr niedrige, im Graph nicht mehr darstellbare Standardabweichung.



Fig. 12:

Chimäre Konstrukte bestehend aus verschiedenen Anteilen des humanen TIMP-3 Promotors, dem 3' fusionierten Promotormodul mit den CDE und CHR Repressorelementen sowie einer DNA für den IL-1-Rezeptor-Antagonisten (kompletter kodierender Bereich) als Effektor. Positionsangaben beziehen sich auf die Hauptstartstelle des TIMP-3 Gens, auf das von Lucibello et al. (EMBO J. 15, 132 (1995)) verwendete System für cdc25C bzw. auf Positionen in der IL-1-Rezeptor-Antagonist DNA (Eisenberg et al., Nature 343, 341 (1990)).

Fig. 13:

Chimäre Promotoren für die Therapie der HIV-Infektion

Die Positionsangaben beziehen sich auf folgende Literatur:

HIV-LTR	(Rosen et al., Cell <u>41</u> , 813 (1985))
CDE-CHR-Inr	(Lucibello et al., EMBO J. <u>14</u> , 132 (1995))
IFN $\alpha$	(Streuli et al., Science <u>209</u> , 1343 (1980))
IRES	(Pelletier und Sonenberg, Nature <u>334</u> , 320 (1988))
RBP9-27	(Reid, PNAS USA <u>86</u> , 840 (1989))

Fig. 14:

Chimäre Konstrukte bestehend aus 5 Myc E-Boxen (Blackwood und Eisenman, Science 251, 1211 (1991)), dem 3' fusionierten cdc25C Basalpromotor mit den CDE und CHR Repressorelementen sowie einer DNA für  $\beta$ -Glucuronidase (kompletter kodierender Bereich) als Effektor. Positionsangaben beziehen sich auf das von Lucibello et al. (1995) verwendete System für cdc25C bzw. auf Positionen in der  $\beta$ -Glucuronidase DNA (Oshima et al., 1987).

Fig. 15:

Positionsangaben der Signalsequenz (MGWSCIIILFLVATAT) des Immunglobulins (HuVHCAMP) beziehen sich auf Riechmann et al., Nature 332, 323 (1988)

B) Alternative: Einbau des Signalpeptids des Ig zur besseren extrazellulären Ausschleusung der  $\beta$ -glucuronidase

Tabelle 1: Rolle von CDE und CHR bei der zellzyklusregulierten Transkription von cdc25C, cyclin A und cdc2

**Tab. 1**

	<i>G<sub>0</sub></i>	<i>Growing</i>	<i>Factor</i>
<b>wt</b>			
cdc25C	0.8	13.1	17.5
cyclin A	0.7	27.1	41.7
cdc2	1.0	41.2	41.2
<b>mCDE(-13)</b>			
cdc25C	7.6	11.6	1.5
cyclin A	13.4	23.9	1.8
cdc2	11.3	33.9	3.0
<b>mCHR(-6/-3)</b>			
cdc25C	14.4	21.0	1.5
cyclin A	15.5	28.3	1.8
cdc2	18.6	38.6	2.1

Ergebnisse transienter Transfektionen in HIH3T3-Zellen sind als RLUs/1000 dargestellt. mCDE: mutiertes CDE (Pos. -13: G → T); mCHR: mutiertes CHR (Pos. -6 bis -3).

Tab. 2: Expression verschiedener Promotor-Luziferase-Konstrukte in normal proliferierenden (A) und serumstimulierenden (B) NIH3T3-Zellen. Nach DEAE-Transfektion von 7  $\mu$  g Plasmid-DNA wurden die NIH3T3-Zellen für 40 h in serumhaltigem (A) oder serumfreien (B) Medium inkubiert, für 4 h mit 20% FKS stimuliert (B) und die Expression des Luziferase-Reportergens bestimmt.

Tabelle 2:

A. Expression in proliferierenden Zellen  
(RLU  $\times 10^3$ )

TIMP-3 $\Delta$ -1010	189,5 $\pm$ 6,4
pRSV-LTR	308,1 $\pm$ 23,4
p5xTRE	59,1 $\pm$ 2,2
Cyclin D1 $\Delta$ -973	27,8 $\pm$ 3,5
pXP2	0,2

B. Relative Induktion durch 20% FKS in FKS-stimulierten versus G0-Zellen

(Faktor)	
TIMP-3 $\Delta$ -1010	8,4 $\pm$ 0,4
p5xTRE	2,4 $\pm$ 0,2
Cyclin D1 $\Delta$ -973	3,5 $\pm$ 0,3
pT81	1,0 $\pm$ 0,2
pXP2	1,2

## Patentansprüche

1. Wirkstoff zur Prophylaxe oder Therapie von Erkrankungen, die durch das Immunsystem bedingt sind dadurch charakterisiert, daß er ein DNA-Konstrukt enthält, welches aus einer Aktivatorsequenz, einem zellzyklusreguliertem Promotormodul und einer DNA-Sequenz für die Wirksubstanz besteht.
2. Wirkstoff nach Anspruch 1), bei welchem das Promotormodul die Elemente CDE-CHR-Inr besitzt und die Positionen  $\leq -20$  bis  $\geq +30$  des cdc25C Promotorbereiches enthält (Nukleotidsequenz GGCTGGCGGAAGGTTT-GAATGGTCAACGCCTGCGGCTGTTGATATTCTTG), wobei CDE das "cell cycle dependent element (Nukleotidsequenz TGGCGG), CHR die cell cycle gene homology region (Nukleotidsequenz GTTTGAA) und Inr die Initiationsstelle (Position +1) sowie die für die Initiation wichtigen benachbarten Sequenzen darstellt.
3. Wirkstoff nach Anspruch 1), enthaltend eine Aktivatorsequenz (Promotor- oder Enhancersequenz), welche durch Transkriptionsfaktoren, im besonderen Maße gebildet in Zellen des blutbildenden Systems, in Synovialzellen, in virusinfizierten Zellen, in Parasiten, in Makrophagen, in Lymphozyten oder in Leukämiezellen reguliert wird.
4. Wirkstoff nach Anspruch 3), enthaltend die CMV-Promotorsequenz, die CMV-Enhancersequenz oder die SV40-Promotorsequenz.
5. Wirkstoff nach Anspruch 3) zur Therapie einer unzureichenden Bildung von Blutzellen, bei welchem die Aktivatorsequenz die Promotorsequenz eines Gens für ein Cytokin oder des Rezeptors für dieses Cytokin darstellt, welches in gering- oder undifferenzierten Zellen des blutbildenden Systems oder in direkt benachbarten Stromazellen aktiviert ist.
6. Wirkstoff nach Anspruch 5), enthaltend die Promotorsequenz für Stem Cell Factor, Interleukin (IL)-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-3, IL-6, LIF oder Granulozyten-Makrophagen-koloniestimulierenden Faktor oder die Promotorsequenz der Rezeptoren für Stem Cell Factor, IL-1 oder IL-3, IL-6, LIF, GM-CSF oder die Promotorsequenz für Interferon Regulatory Factor 1 (IRF-1).

7. Wirkstoff nach Anspruch 3) zur Therapie von Autoimmunerkrankungen, Allergien, Entzündungen und zur Verhütung von Organabstoßungen, bei welchem die Aktivatorsequenz die Promotorsequenz eines Gens für ein Protein darstellt, das bei Aktivierung von Makrophagen oder von Lymphozyten verstärkt gebildet wird.
8. Wirkstoff nach Anspruch 7), enthaltend die Promotorsequenz für Interleukin (IL)-1 $\alpha$  oder IL-1 $\beta$ , IL-1-Rezeptor, IL-2, IL-2-Rezeptor, Interferon  $\gamma$ , IL-3, IL-3-Rezeptor, IL-4, IL-4-Rezeptor, IL-5, IL-6, Interferon Regulatory Factor 1, IFN- $\gamma$  Responsive Promotor, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, Granulozyten-Makrophagen-koloniestimulierender Faktor (GM-CSF), GM-CSF-Rezeptor, Granulozyten-koloniestimulierender Faktor (G-CSF), Makrophagen-Colony Stimulating Factor Rezeptor, Makrophagen Scavenger Typ I oder Typ II Rezeptor oder Leukämie-inhibierender Faktor (LIF), LFA-1, MAC-1 oder p150,95.
9. Wirkstoff nach Anspruch 1) zur Therapie der Arthritis, enthaltend eine Aktivatorsequenz (Promotor- oder Enhancersequenz), welche durch Transkriptionsfaktoren, gebildet in Synovialzellen oder Entzündungszellen, reguliert wird.
10. Wirkstoff nach Anspruch 9), enthaltend die Promotorsequenz für ein Matrixmetalloproteinase-Gen (MMP), ein Tissue Inhibitor of Metalloproteinases (TIMP)-Gen oder für den M-CSF Rezeptor oder Makrophagen Scavenger Typ I oder Typ II Rezeptor.
11. Wirkstoff nach Anspruch 10), enthaltend die Promotorsequenz für das MMP-1-, MMP-2-, MMP-3-, MMP-9-, TIMP-1- oder TIMP-2-Gen.

12) Wirkstoff nach Anspruch 10), enthaltend die Promotorsequenz für das Gen des Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-3, enthaltend promotoraktive DNA-Fragmente, enthaltend Position  $\leq -463$  bis  $\geq -2$  der folgenden Nukleotidsequenz:

```

-500 ATGGCTTCCC ATATCCCAGA GAGTAAGAAG CAGAGAGAGA GAGAGAAAGA GAGAGAGTTT
-440 GGGTCTTTCT CCTCTGTGCC TGCTCTCTCC AGAGAAACTG GAGGGGTAGC AGTTAGCATT
-380 CCCCCGCTGG TTCCACCAAG CACAGTCAAG GTCCTAGGA CATGGCCACC CCTCACCTGT
-320 GGAAGCGGTC CTGCTGGGGT GGGTGGGTGT TAGTTGGTTC TGGTTGGGT CAGAGACACC

```

## NF1

```

-260 CAGTGGCCCA GGTGGGCGTG GGGCCAGGGC GCAGACGAGA AGGGGCACGA GGGCTCCGCT
-200 CCGAGGACCC AGCGGCAAGC ACCGGTCCCG GCGCGGCCCC AGCCACCCCA CTCGCGTGCC

```

Sp1 Sp1

```

-140 CACGGCGGCA TTATCCCTA TAAGATCTG AACGATCCGG GGGCGGCCCC GCGCCGTTAC

```

Sp1

C/EBP

```

-80 CCGTTGCCCC CGGCGCGGCC CCCTTTTGG AGGCCGATG AGGTAATGCG GCCTGCCAT

```

Sp1 ↓ Start

```

-20 TGGTCTGAGG GGGCGGGGCC CAACAGCCCG AGCGGGGTC CCGGGGGCC CAGCGCTATA

```

13. Wirkstoff nach Anspruch 12), enthaltend promotoraktive DNA-Fragmente für das Gen des Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-3, enthaltend
  - Position  $\geq -463$  bis  $\leq -10$   
oder
  - Position  $\geq -112$  bis  $\leq -2$   
oder
  - Position  $\geq -112$  bis  $\leq -10$der unter Anspruch 12) aufgeführten Nukleotidsequenz.
14. Wirkstoff nach Anspruch 1-3) zur Therapie von Virusinfektionen, bei welchem die Aktivatorsequenz die Promotorsequenz für Viren darstellt, die die von ihnen infizierten Zellen transformieren und zur Proliferation anregen.
15. Wirkstoff nach Anspruch 14), enthaltend die Promotorsequenz des Hepatitis B Virus, Hepatitis C Virus, Herpes Simplex Virus I und II, der humanen Papillomaviren, insbesondere HPV-16 und HPV-18, des humanen immundefizienten Virus, im besonderen HIV-1, HIV-2 und HIV-3, des Epstein-Barr Virus oder des humanen T-Zell-Leukämie-Virus.
16. Wirkstoff nach Anspruch 1) zur Prophylaxe von Infektionen, enthaltend die Promotorsequenz für Interleukin (IL)-1 $\alpha$  oder IL-1 $\beta$ , IL-1-Rezeptor, IL-2, IL-2-Rezeptor, Interferon  $\gamma$ , IL-3, IL-3-Rezeptor, IL-4, IL-4-Rezeptor, IL-5, IL-6, Interferon Regulatory Factor 1, IFN- $\gamma$  Responsive Promotor IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, Granulozyten-Makrophagen-koloniestimulierender Faktor (GM-CSF), M-CSF Rezeptor, Makrophagen Scavenger Typ I oder Typ II Rezeptor, GM-CSF-Rezeptor, Granulozyten-koloniestimulierender Faktor (G-CSF) oder Leukämie-inhibierender Faktor (LIF), LFA-1, MAC-1 oder p150,95.
17. Wirkstoff nach Anspruch 1) zur Therapie von Leukämien, enthaltend eine Aktivatorsequenz (Promotor- oder Enhancersequenz), welche durch Transkriptionsfaktoren, gebildet in Leukämiezellen, aktiviert wird.
18. Wirkstoff nach Anspruch 17), enthaltend
  - die Promotorsequenz für c-myc, bcl-2, bcl-1, IL-6, IL-10, TNF $\alpha$  oder TNF $\beta$

- oder
- die Bindungssequenz für Proteine, gebildet in HOX-11, BCR-Abl, E2A-PBX-1, PML/RARA oder
  - die humane myc E-Box in einfacher oder mehrfacher Form.
19. Wirkstoff nach Anspruch 5), bei welchem die DNA-Sequenz für die Wirksubstanz Erythropoietin, G-CSF, GM-CSF, IL-3, LIF, IL-11 und/oder Thrombopoietin kodiert.
20. Wirkstoff nach Anspruch 7), bei welchem die DNA-Sequenz für die Wirksubstanz
- IFN $\alpha$ , IFN $\beta$ , IFN  $\gamma$ , IL-10, lösliche IL-4-Rezeptoren, TGF $\beta$ , IL-12, lösliche IL-1-Rezeptoren, lösliche IL-2-Rezeptoren, lösliche IL-6-Rezeptoren, IL-1-Rezeptorantagonisten, IL-1, IL-4, IL-6, IL-9, IL-13, TNF $\alpha$  oder TNF $\beta$  kodiert oder
  - einen immunsuppressiven Antikörper, im besonderen mit Spezifität für CD4, CD8, CD3, IL-2-Rezeptor, IL-1-Rezeptor oder IL-4-Rezeptor, CD2, LFA-1, CD28, CD40-Linker oder CD40 kodiert oder
  - Fragmente dieses Antikörpers, die VH und VL enthalten oder dessen über einen Linker verbundene VH und VL Fragmente darstellen kodiert.
21. Wirkstoff nach Anspruch 9), bei welchem die DNA-Sequenz für eine antientzündliche Substanz
- einen Inhibitor für entzündungserregende Interleukine oder Wachstumsfaktoren oder
  - ein entzündungshemmendes Interleukin oder
  - einen Wachstumsfaktor, welcher die Synthese der extrazellulären Matrix stimuliert oder
  - die Superoxiddismutase oder
  - einen Proteinaseinhibitor kodiert.
22. Wirkstoff nach Anspruch 21), bei welchem
- der Inhibitor für entzündungserregende Interleukine oder Wachstumsfaktoren der Interleukin-1-Rezeptorantagonist, der lösliche Interleukin-1-Rezeptor oder der lösliche Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) Rezeptor ist



oder

- das entzündungshemmende Interleukin IL-4, -6 oder -10 ist oder
- der Wachstumsfaktor, welcher die Synthese der extrazellulären Matrix stimuliert, Insulin-like Growth Factor oder Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ) ist oder
- der Proteinaseinhibitor Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 (TIMP-1), TIMP-2 oder TIMP-3 darstellt.

23. Wirkstoff nach Anspruch 14), bei welchem die DNA-Sequenz für die Wirksubstanz

- IFN $\alpha$ , IFN $\beta$ , IFN  $\gamma$ , TNF, im besonderen TNF $\alpha$  IL-1 oder TGF $\beta$  kodiert oder
- einen Antikörper einer Spezifität kodiert, die das jeweilige Virus inaktiviert oder
- ein VH und VL enthaltendes Fragment dieses Antikörpers oder dessen über einen Linker verbundene VH und VL Fragment kodiert oder
- ein Rev-bindendes Protein kodiert, im besonderen RBP9-27, RBP1-8U oder RBP1-8D.

24. Wirkstoff nach Anspruch 16), bei welchem die DNA-Sequenz für die Wirksubstanz

- das Neutralisations- oder Inaktivierungsantigen eines Virus, eines Bakteriums oder eines Parasiten kodiert oder
- für einen Antiidiotyp-Antikörper oder ein Fragment dieses Antikörpers, dessen "complementarity determining regions" eine Kopie der Protein- oder Kohlenhydratstruktur des Neutralisationsantigens eines Infektionserregers ist.

25. Wirkstoff nach Anspruch 24), bei welchem die DNA-Sequenz kodiert für die Antigene von Influenza, HIV, Tollwut, HSV, RSV, Parainfluenza-V, Rotavirus, VZV, CMV, Masern-V, HPV, HBV, HCV, HDV, HEV, HAV, Vibrio cholera-Toxin, Borrelia-Burgdorferi, Helicobacter pylori oder Malaria.

26. Wirkstoff nach den Ansprüchen 7), 14) und 17), bei welchen die Wirksubstanz eine DNA-Sequenz für einen Zellzyklusinhibitor darstellt.

27. Wirkstoff nach Anspruch 26), bei welchem die DNA-Sequenz für den Zellzyklusinhibitor
- das Retinoblastomprotein pRb/p110 oder für die verwandten p107 und p130 Proteine oder
  - das p53 Protein oder
  - das p21 Protein, das P16 Protein oder einen anderen "Cyclin-dependent Kinase (cdK)"- Inhibitor oder
  - das GADD45 Protein oder
  - das bak Protein oder
  - ein zytotoxisches Protein oder
  - ein zytostatisches Cytokin oder oder
  - ein Enzym für die Spaltung von Vorstufen von Zytostatika in Zytostatika kodiert.
28. Wirkstoff nach Anspruch 27),
- bei welchem die DNA-Sequenz für das Retinoblastomprotein (pRb/p110) durch Austausch der Aminosäuren in den Positionen 246, 350, 601, 605, 780, 786, 787, 800 und 804 nicht mehr phosphorylierbar wird, ohne daß jedoch das mutierte pRb/p110 seine Bindungsaktivität mit dem großen T-Antigen einbüßt, im besonderen, daß die Aminosäuren Thr-246, Ser-601, Ser-605, Ser-780, Ser-786, Ser-787 und Ser-800 mit Ala, der Aminosäure Thr-350 mit Arg und der Aminosäure Ser-804 mit Glu ausgetauscht werden oder
  - bei welchen die DNA-Sequenz für das p107 oder das P130 Protein in analoger Weise wie beim mutierten pRb/p110 mutiert ist.
29. Wirkstoff nach Anspruch 27), bei welchem die DNA-Sequenz für das Protein p53 C-terminal verkürzt ist um das Serin 392.
30. Wirkstoff nach Anspruch 27), bei welchem die DNA-Sequenz für das zytotoxische Protein bzw. zytostatische Cytokin Perforin, Granzym, IL-2, IL-4, IFN $\alpha$ , IFN $\beta$ , IFN  $\gamma$ , TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ , TGF $\beta$  oder Oncostatin M kodiert.
31. Wirkstoff nach Anspruch 27), bei welchem das Enzym eine Herpes Simplex Virus Thymidin-Kinase, Cytosindeaminase, Varizella Zoster Virus Thymidin-

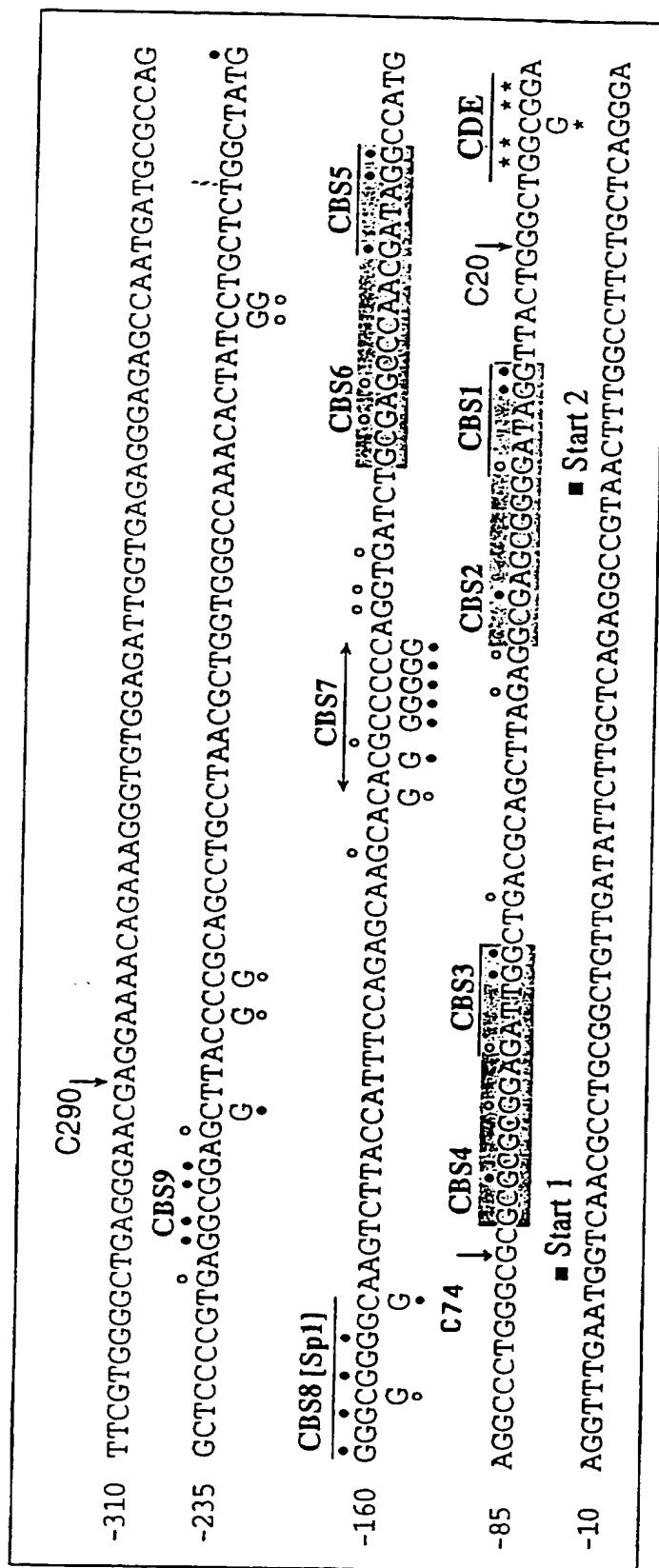
Kinase, Nitroreduktase,  $\beta$ -Glucuronidase (im besonderen eine humane, pflanzliche oder bakterielle  $\beta$ -Glucuronidase), Carboxypeptidase (vorzugsweise von *Pseudomonas*), Lactamase (vorzugsweise von *Bazillus cereus*), Pyroglutamat-Aminopeptidase, D-Aminopeptidase, Oxidase, Peroxidase, Phosphatase, Hydroxynitrilase, Protease, Esterase oder eine Glycosidase ist, wobei die homologe Signalsequenz oder zur besseren zellulären Ausschleusung eine heterologe Signalsequenz verwendet wird.

32. Wirkstoff nach Anspruch 31), bei welchem durch Punktmutationen der DNA-Sequenz des Enzyms die lysosomale Speicherung verringert und die extrazelluläre Ausschleusung erhöht ist.
33. Wirkstoff nach Anspruch 19-32), welcher die DNA-Sequenzen von mehreren gleichen oder unterschiedlichen Wirksubstanzen enthält, wobei zwei DNA-Sequenzen durch eine DNA-Sequenz für die internal ribosome entry site miteinander verbunden sind.
34. Wirkstoff nach Anspruch 33), bei welchem eine Wirksubstanz das Antigen oder den Antiidiotyp-Antikörper für dieses Antigen von einem Infektionserreger kodiert und die zweite Wirksubstanz ein Cytokin oder einen Cytokinrezeptor kodiert, im besonderen
  - TGF $\beta$ , IFN $\alpha$ , IFN $\beta$ , IFN  $\gamma$ , IL-12 oder lösliche IL-4-Rezeptoren oder
  - IL-4, IL-6, LIF, IL-9, IL-10, IL-13, TNF $\alpha$  oder TNF $\beta$  oder
  - IL-1, IL-2, M-CSF oder GM-CSF.
35. Wirkstoff nach Anspruch 1-34), eingefügt in einen Vektor.
36. Wirkstoff nach Anspruch 35), bei welchem der Vektor ein Virus ist.
37. Wirkstoff nach Anspruch 36), bei welchem das Virus ein Retrovirus, Adenovirus, Adeno-assoziiertes Virus, Herpes Simplex Virus oder Vaccinia Virus darstellt.
38. Wirkstoff nach Anspruch 1-34) eingefügt in ein Plasmid.
39. Wirkstoff nach Anspruch 35-38), zubereitet in einem kolloidalen Dispersionssystem.

40. Wirkstoff nach Anspruch 39), bei welchem das kolloidale Dispersionssystem Liposomen sind.
41. Wirkstoff nach Anspruch 39), bei welchem das kolloidale Dispersionssystem Polylysin-Liganden sind.
42. Wirkstoff nach Anspruch 1-41) ergänzt um einen Liganden, welcher an Membranstrukturen von haematopoietischen Zellen, an aktivierten Lymphozyten, aktivierten Makrophagen, aktivierten Synovialzellen, virusinfizierten Zellen oder an Leukämiezellen bindet.
43. Wirkstoff nach Anspruch 42), bei welchem der Ligand
- ein polyklonaler oder monoklonaler Antikörper oder ein Antikörperfragment hiervon ist, der mit seinen variablen Domänen spezifisch an die Zellmembran bindet oder
  - ein polyklonaler oder monoklonaler Antikörper oder ein Antikörperfragment hiervon ist, der mit seinen konstanten Domänen an Fc-Rezeptoren auf der Zellmembran bindet oder
  - ein Cytokin oder Wachstumsfaktor oder ein Fragment bzw. eine Teilsequenz hiervon ist, der an die entsprechenden Rezeptoren auf der Zellmembran bindet oder
  - ein endständig Galactose enthaltender Ligand ist, der den Asialoglycoproteinrezeptor bindet oder
  - ein Transferrin oder Fragment hiervon ist, das an den Transferrin-Rezeptor bindet oder
  - ein Insulin oder ein Fragment hiervon ist, das an den Insulin-Rezeptor bindet oder
  - ein endständiger, Mannose enthaltender Ligand ist, der an den Mannose-6-Phosphat-Rezeptor bindet.
44. Wirkstoff nach Anspruch 43), bei welchem die Zellmembranstrukturen Rezeptoren für Cytokine, Wachstumsfaktoren, Interferone, Chemokine

darstellen, insbesondere Rezeptoren für den Stem Cell Factor, für IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, Interferon  $\alpha$ , Interferon  $\beta$ , Interferon  $\gamma$ , LIF, GM-CSF, G-CSF, TNF $\alpha$ , EGF, FGF, TGF $\beta$ , PDGF oder IGF.

45. Wirkstoff nach Anspruch 21), bei welchem die Membranstruktur von Synovialzellen oder Entzündungszellen Vimentin, Fibronectin, IL-1-Rezeptor, IL-2-Rezeptor, TNF $\alpha$ -Rezeptor, IL-4-Rezeptor, IL-10-Rezeptor, IGF-Rezeptor, TGF $\beta$ -Rezeptor oder Mannose-6-Phosphatrezeptor ist.
46. Wirkstoff nach Anspruch 43), bei welchem die Zellmembranstrukturen Antigene sind, die durch die Infektion mit Viren hervorgerufen werden, insbesondere durch HBV, HCV, HAV, HSV, HPV, EBV, HTLV oder HIV.
47. Wirkstoff nach Anspruch 43), bei welchem die Membranstruktur von Leukämiezellen Rezeptoren für IFN $\alpha$ , IL-2, FGF, TGF $\beta$  oder für Retinoide sind.
48. Wirkstoff nach Anspruch 1-47), bei welchem der Vektor gemischt wird mit einem Cytokin, einem Cytokinrezeptor, einem Adjuvans oder mit Substanzen, welche die Aufnahme und Immunisierung über die Schleimhaut erleichtern.
49. Wirkstoff nach Anspruch 48), bei welchem zugemischt wurde
  - IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IFN- $\gamma$ , M-CSF, GM-CSF und/oder IL-4-Rezeptor oder
  - Liposomen, bioabbaubare Polymeren, Muramyl-dipeptide, Lipopolysaccharide, Lipid A, oder Al(OH) $_3$  oder Ca(OH) $_3$ .
50. Wirkstoff nach Anspruch 1-49) in einer Arzneimittelzubereitung für die Injektion in ein Gewebe wie Muskel, Bindegewebe, Leber, Niere, Milz, Lunge, Haut, für die lokale Applikation auf die Haut oder auf Schleimhäute, für die Injektion in Körperhöhlen wie Gelenke, Pleuralraum, Peritonealraum, Subarachnoidalraum oder für die Injektion in das Blutgefäßsystem, wie intraarterielle oder intravenöse Injektion oder für die orale Aufnahme.



**Fig. 1**

2 / 15

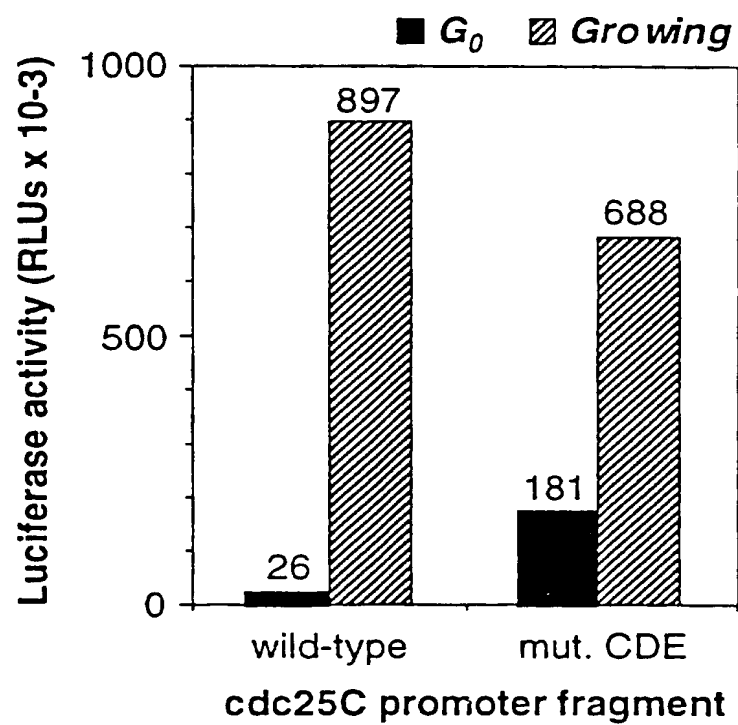


Fig. 2

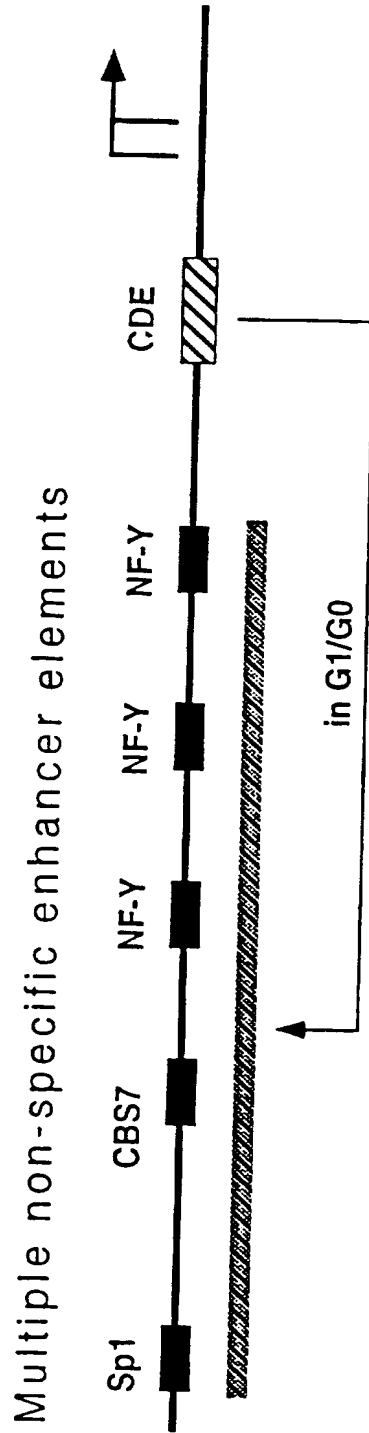


Fig. 3



4/15

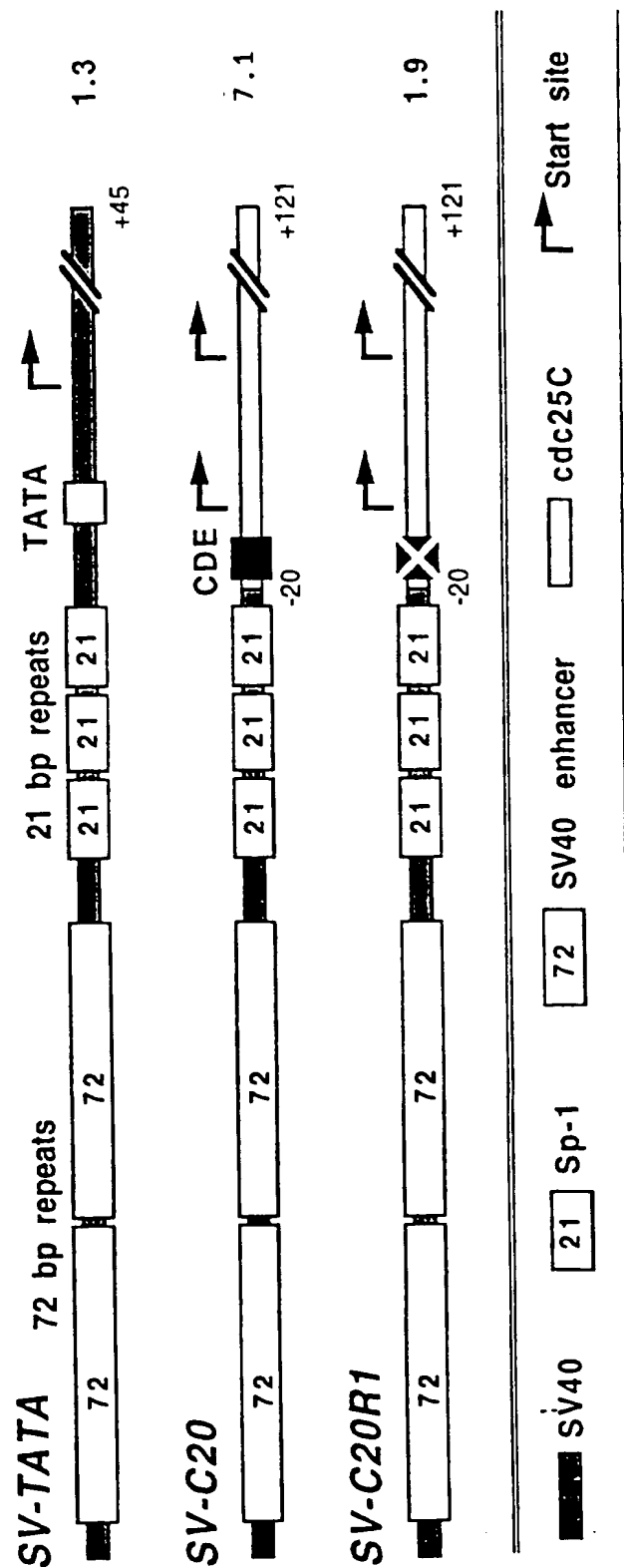


Fig. 4

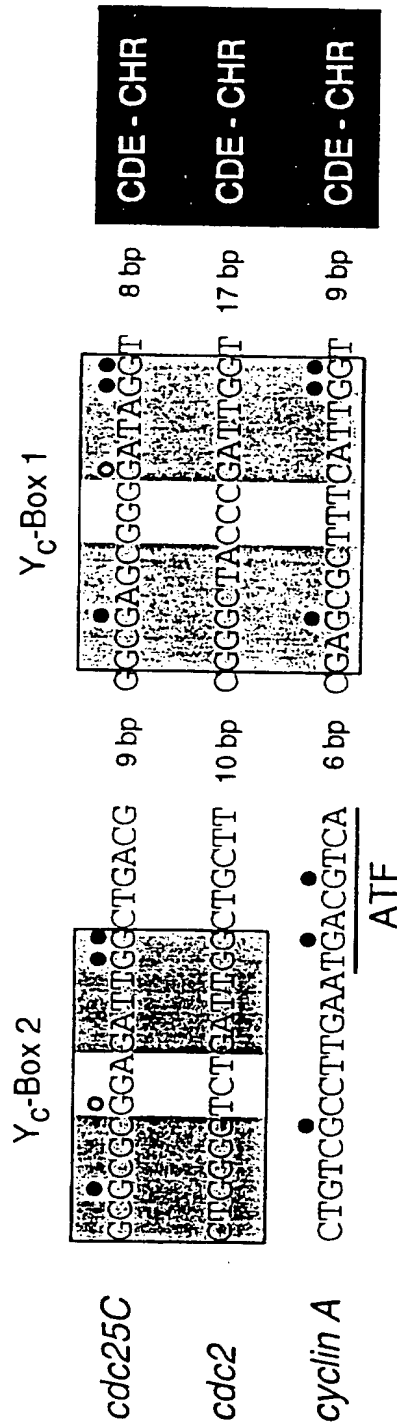


Fig. 5

6/15

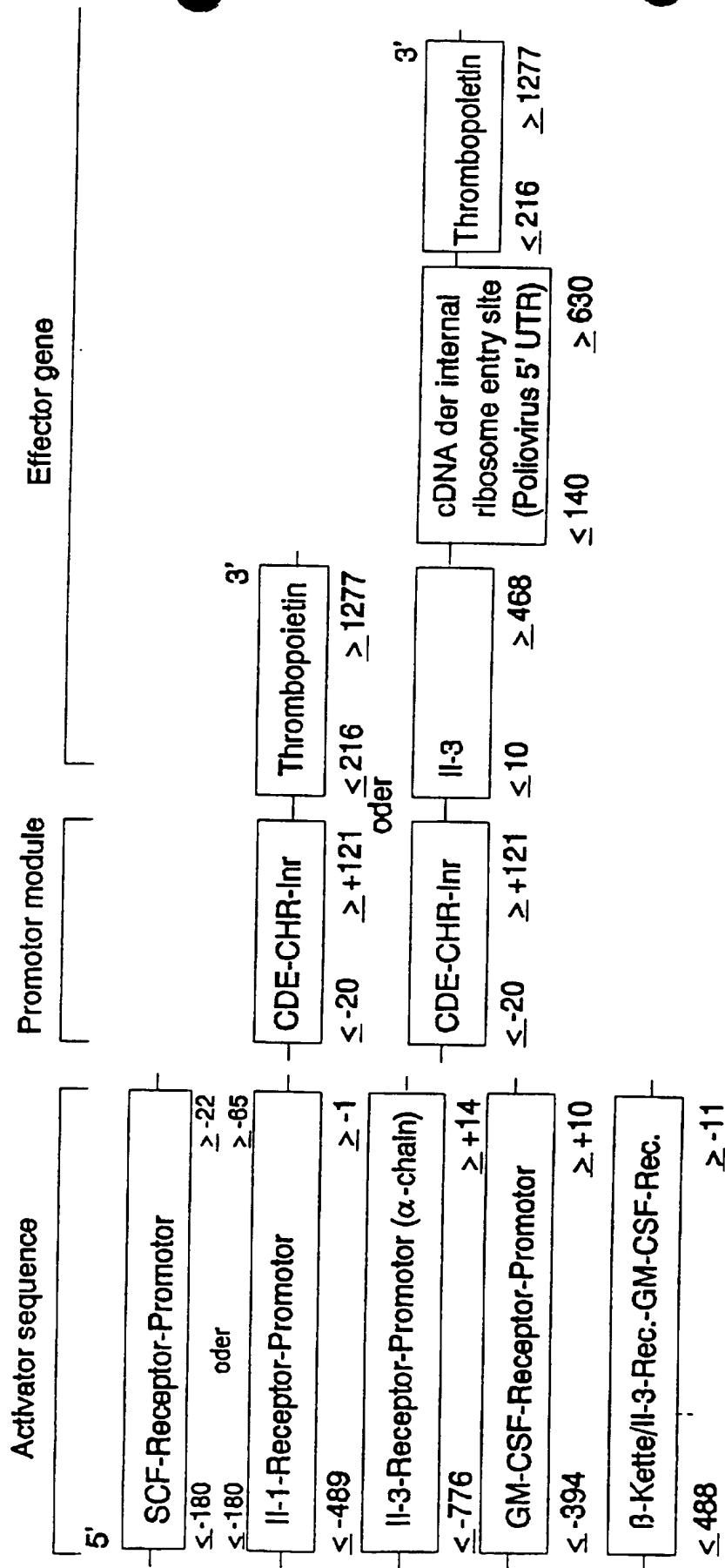


Fig. 6

7/15

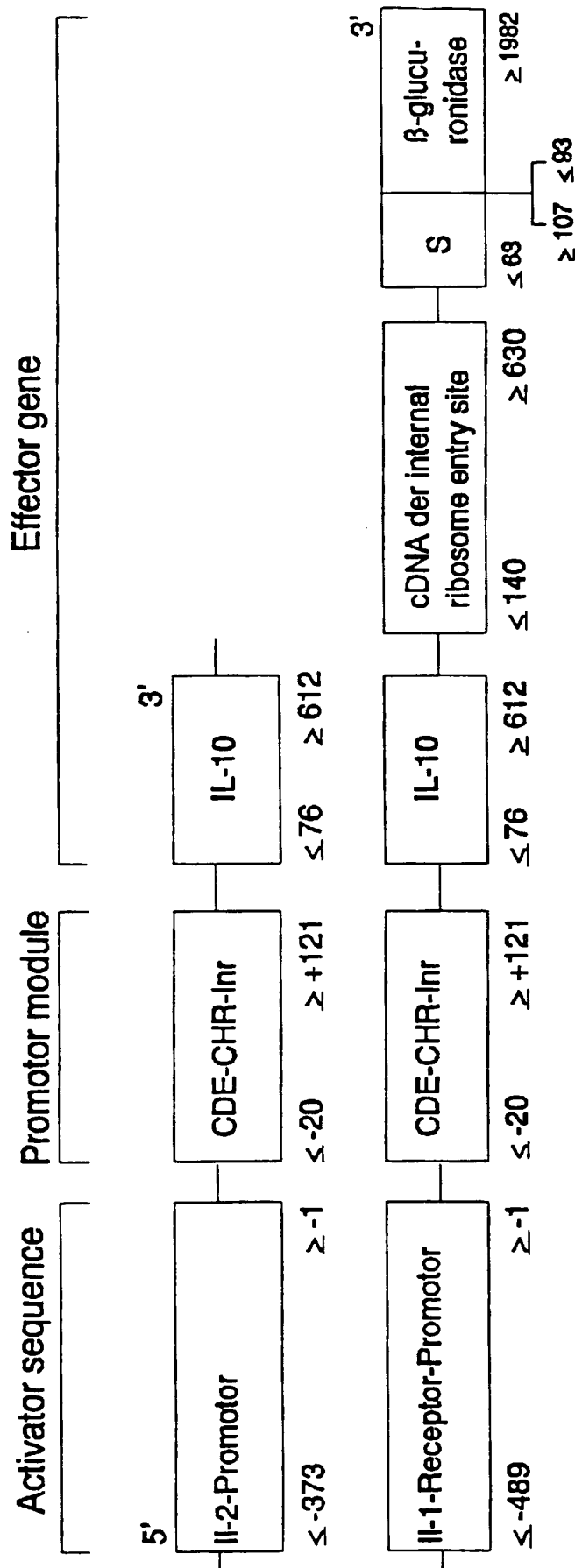


Fig. 7

ERSATZBLATT (REGEL 26)

8/15

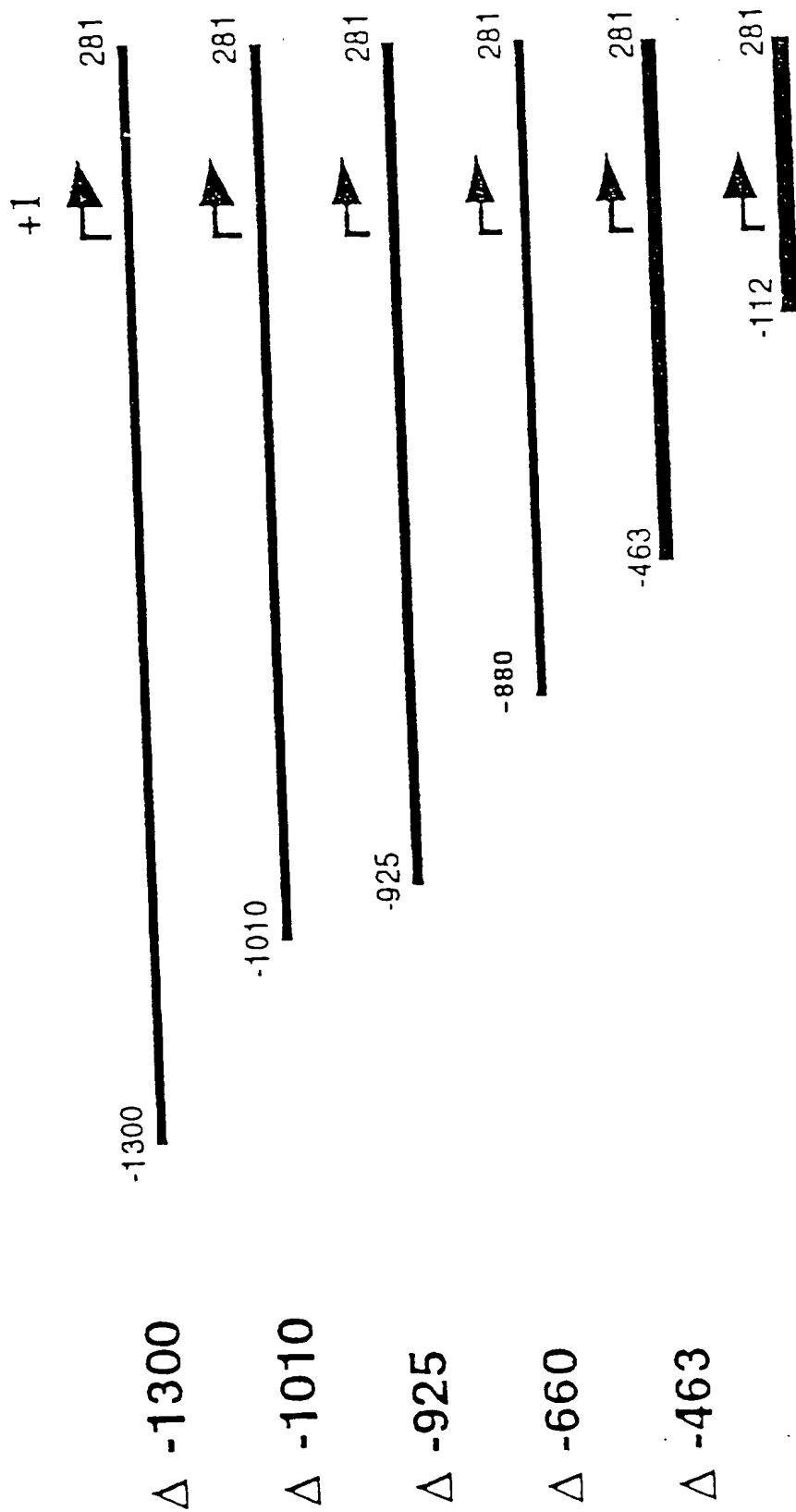


Fig. 8

-500 ATGGCTTCCC ATATCCCA GAGTAAGAAC CAGAGAGAGA GAGAGAAAGA GAGAGAGTTT  
-440 GGTCTTTCT CCTCTGTGCC TGCTCTCTCC AGAGAAACTG GAGGGGTAGC AGTAGCATT  
-380 CCCCCGCTGG TTCCACCAAG CACAGTCAAG GTCTCTAGGA CATGGCCACC CCTCACCTGT  
-320 GGAAGCGGTC CTGCTGGGT GGGTGGGTGT TAGTTGGTTC TGGTTGGGT CAGAGACAAC

**NF1**

-260 CAGTGGCCCA GGTTGGCGTG GGGCCAGGC GCAGACGAGA AGGGGCACGA GGGCTCCGCT  
-200 CCGAGGACCC AGCGGCAAGC ACCGGTCCCG GCGCGCCCC AGCCACCCA CTCGGTGCC

**Sp1      Sp1      sp1**

-140 CACGGCGGCA TTATTCCCTA TAAGGATCTG AACGATCCG GGCGGGCCCC GCCCCTTAC

**Sp1                  C/EBP**

-80 CCCTTGCCCC CGCCCCCGCC CCCTTTTGG AGGGCCGATG...AGGTAATGCG GCTCTGCCAT

**Sp1      ↓ Start**

-20 TGGTCTGAGG GGCGGGGCCC CAACAGCCCC AGCGGGGTC CCCGGGGCC CAGCGCTATA  
+42 TCACTCGGCC GCCCAGGCAG CGGGCAGAG CGGGCAGCAG GCAGCGGGCG GCGGCTCAGA

**Fig. 9**

10/15

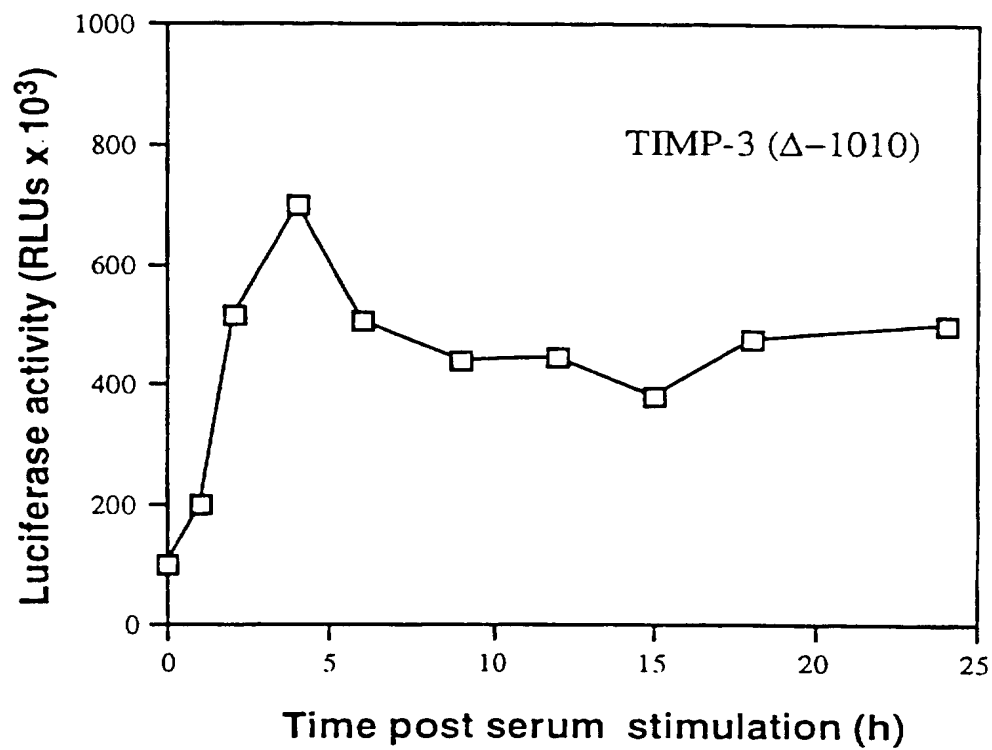
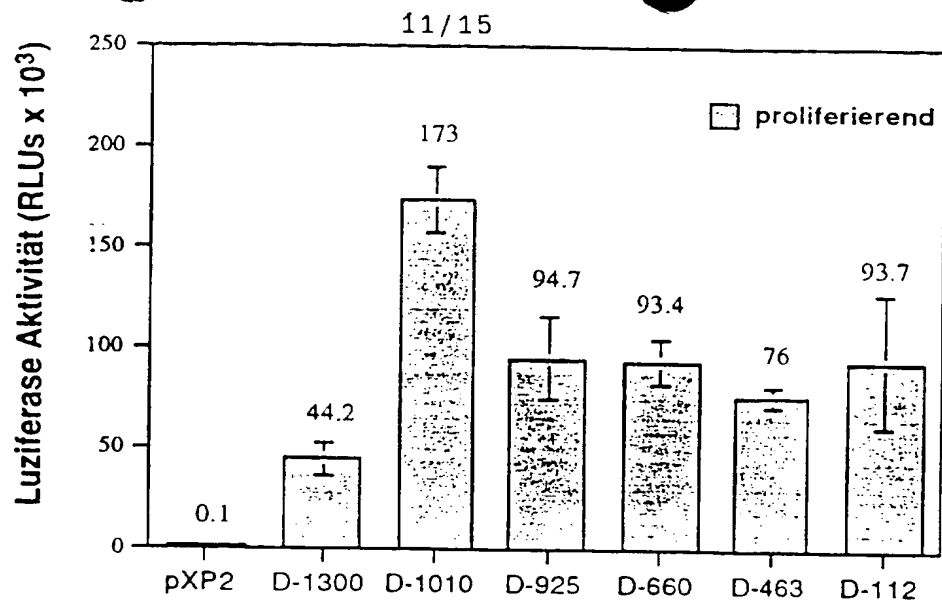
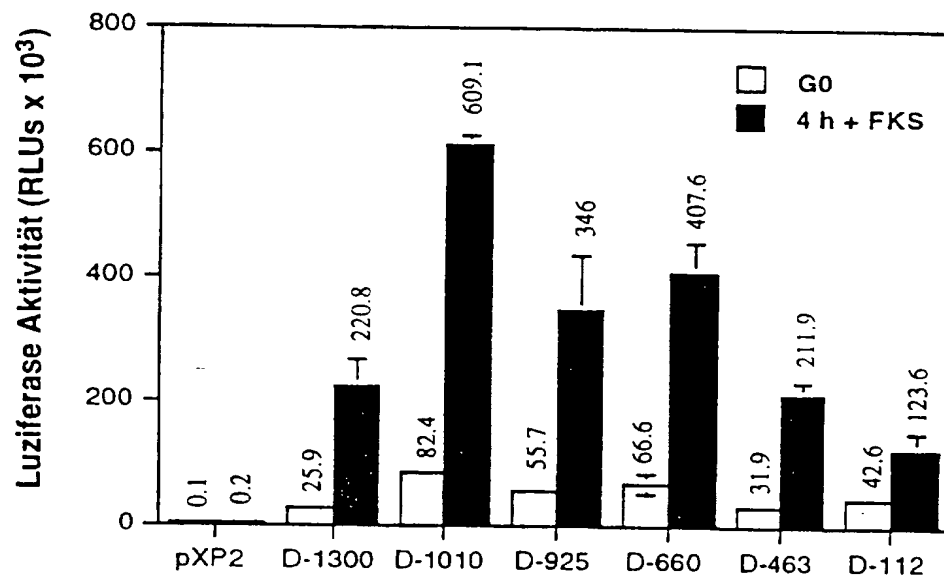


Fig. 10

a



b



Relative Induktion :

8.5x	7.4x	6.2x	6.1x	6.6x	2.9x
------	------	------	------	------	------

Fig. 11



12/15

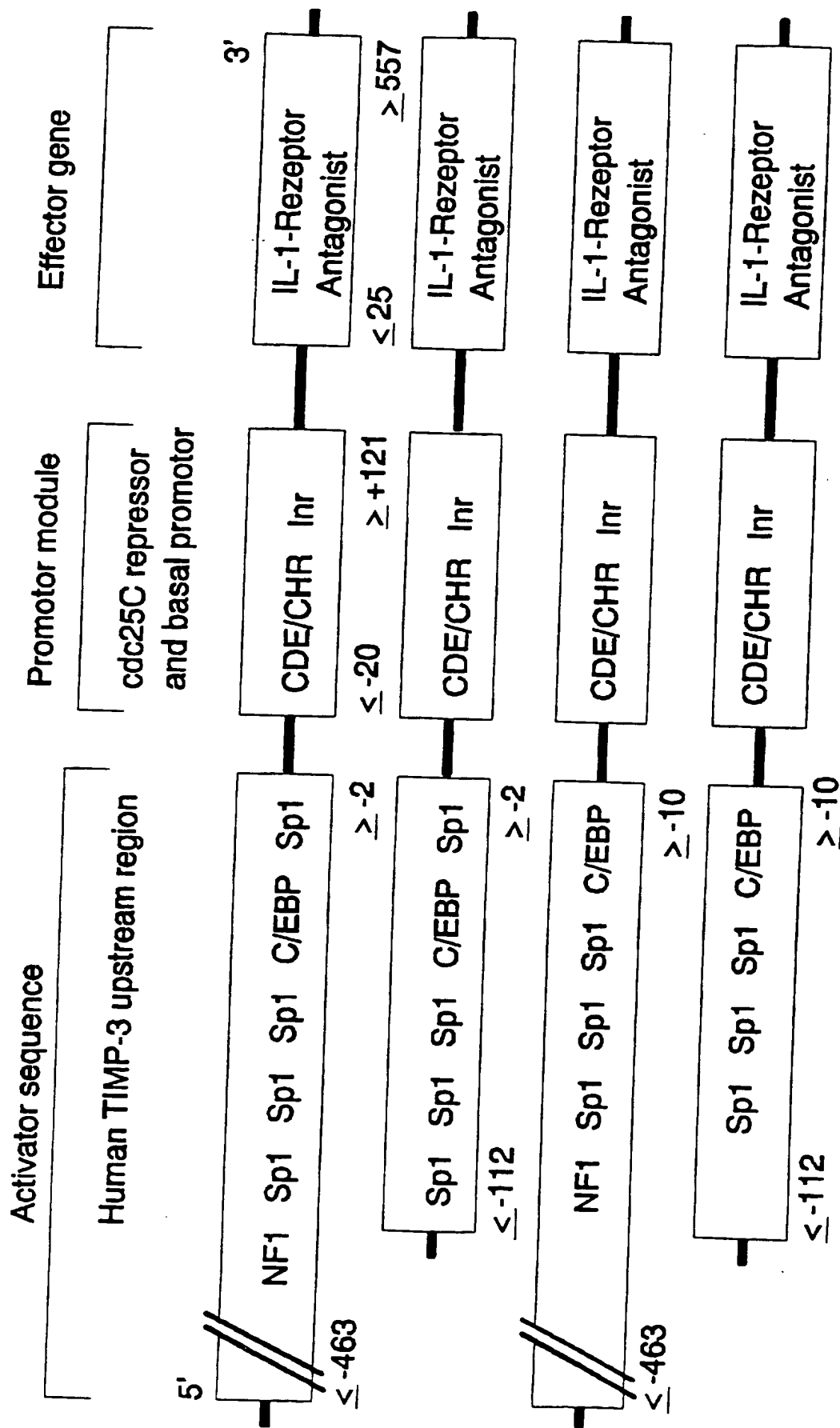


Fig. 12

13/15

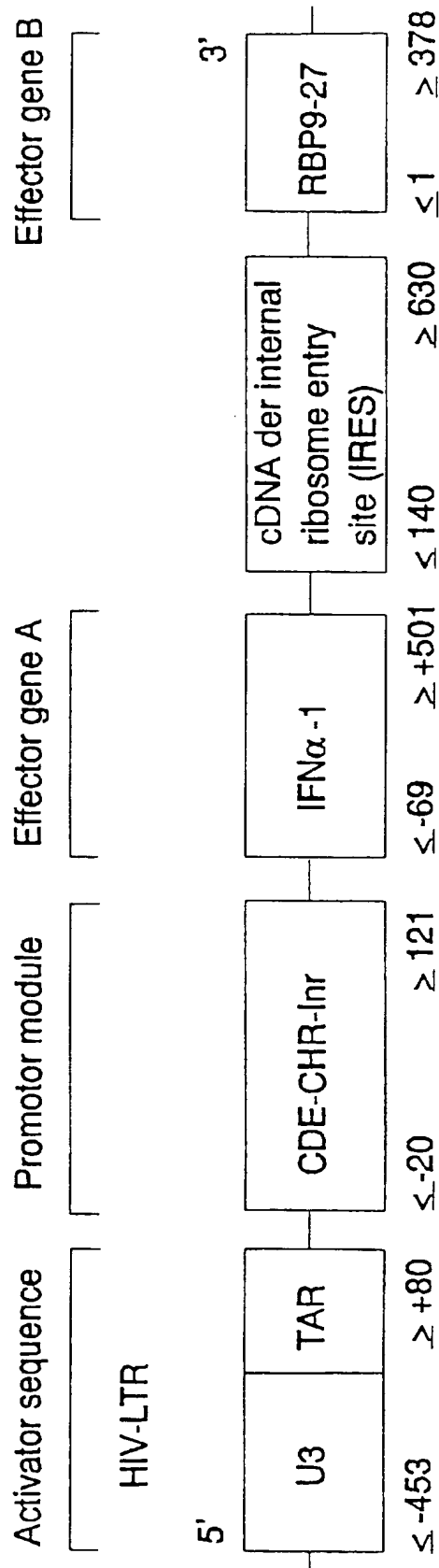


Fig. 13

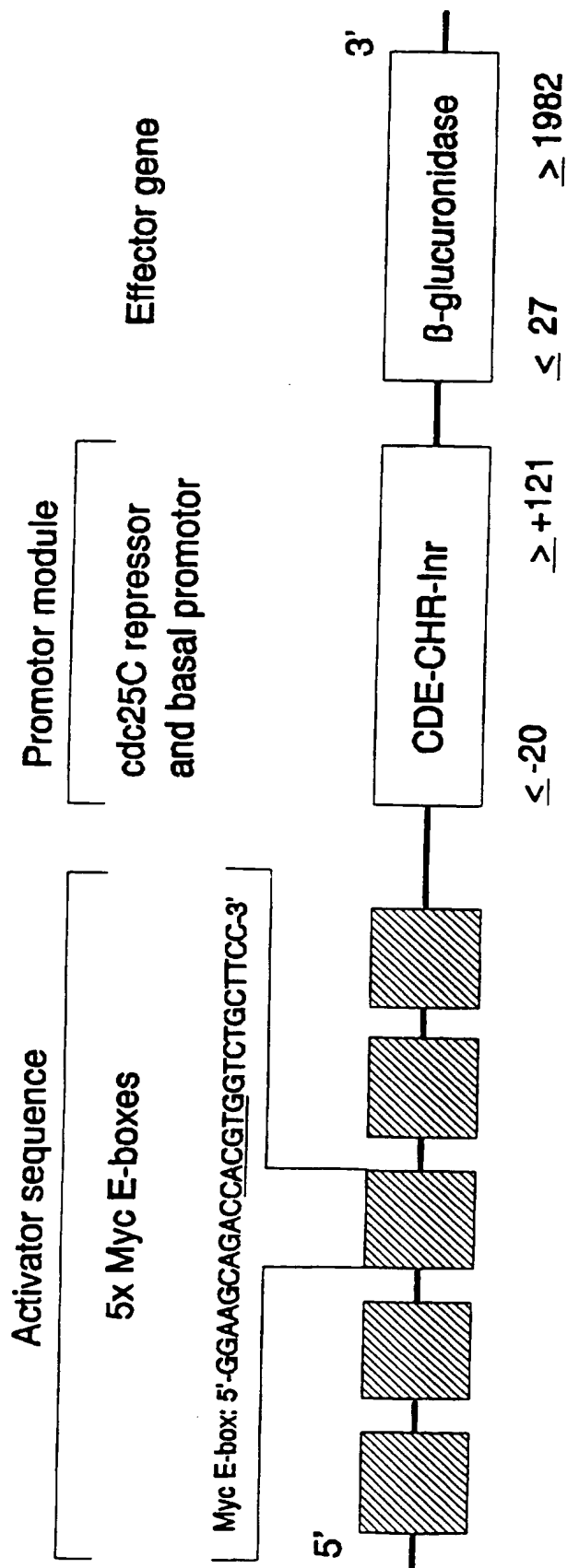


Fig. 14

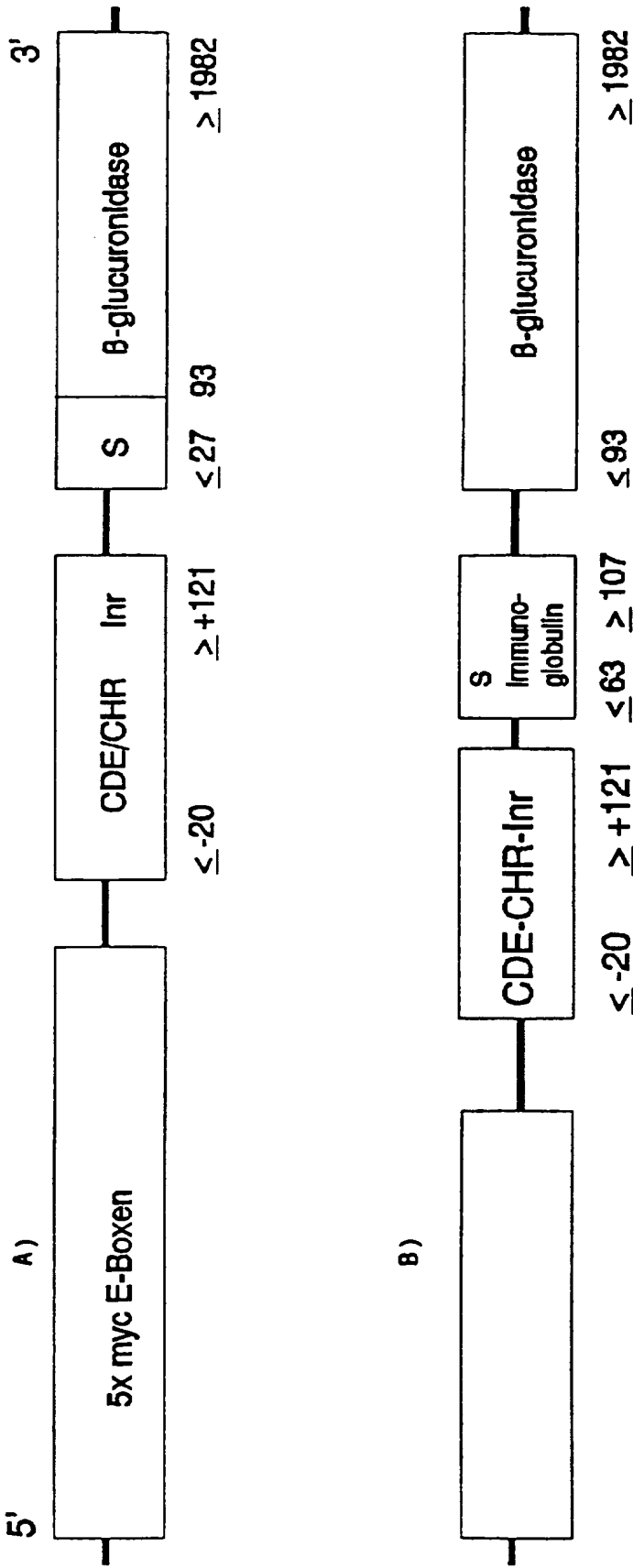


Fig. 15

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PC1/EP 95/03371

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 6 C12N15/85 A61K48/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 6 C12N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO,A,92 11359 (UNIV. OF PITTSBURGH OF THE COMMONWEALTH SYSTEM OF HIGHER EDUCATION) 9 July 1992 see the whole document ---	1-50
A	WO,A,93 25673 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 23 December 1993 see example 27 -----	1,5

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

4 January 1996

Date of mailing of the international search report

24.01.96

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Cupido, M

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/EP 95/03371

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9211359	09-07-92	EP-A- JP-T- 0563239 6504440	06-10-93 26-05-94
WO-A-9325673	23-12-93	AU-B- AU-B- AU-B- CA-A- CA-A- EP-A- EP-A- JP-T- JP-T- WO-A- WO-A- 3467193 4407593 4528493 2126101 2134773 0625207 0646178 7507450 7502510 9312240 9324640	19-07-93 30-12-93 04-01-94 24-06-93 09-12-93 23-11-94 05-04-95 24-08-95 16-03-95 24-06-93 09-12-93

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 95/03371

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 6 C12N15/85 A61K48/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12N A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO,A,92 11359 (UNIV. OF PITTSBURGH OF THE COMMONWEALTH SYSTEM OF HIGHER EDUCATION) 9.Juli 1992 siehe das ganze Dokument ---	1-50
A	WO,A,93 25673 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 23.Dezember 1993 siehe Beispiel 27 -----	1,5



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*Z\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

4. Januar 1996

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

24.01.96

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+ 31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Cupido, M

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 95/03371

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO-A-9211359	09-07-92	EP-A- 0563239 JP-T- 6504440	06-10-93 26-05-94
WO-A-9325673	23-12-93	AU-B- 3467193 AU-B- 4407593 AU-B- 4528493 CA-A- 2126101 CA-A- 2134773 EP-A- 0625207 EP-A- 0646178 JP-T- 7507450 JP-T- 7502510 WO-A- 9312240 WO-A- 9324640	19-07-93 30-12-93 04-01-94 24-06-93 09-12-93 23-11-94 05-04-95 24-08-95 16-03-95 24-06-93 09-12-93

Formblatt PCT/ISA/210 (Anhang Patentfamilie)(Juli 1992)